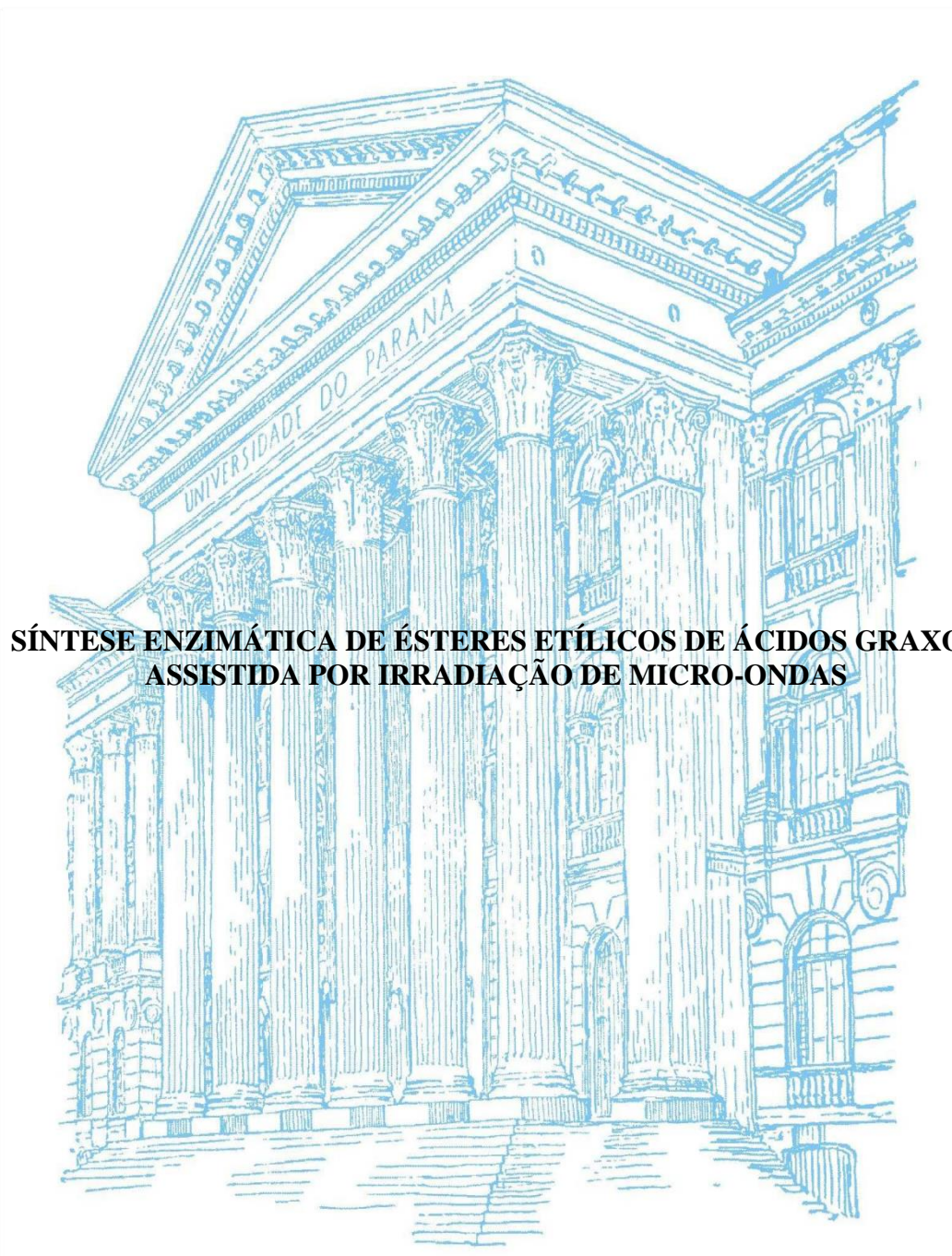


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAÍS PASTRE DILL



**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS
ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS**

CURITIBA

2015

LAÍS PASTRE DILL

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS
ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Química, no Curso de Pós-Graduação, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Pereira Ramos

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nadia Krieger

CURITIBA

2015

D578s

Dill, Laís Pastre

Síntese enzimática de ésteres etílicos de ácidos graxos assistida por irradiação de micro-ondas/ Laís Pastre Dill. – Curitiba, 2015.
101 f. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2015.

Orientador: Luiz Pereira Ramos – Co-orientador: Nadia Krieger.
Bibliografia: p. 91-101.

1. Biodiesel. 2. Ésteres. 3. Solvólise. 4. Catalisadores. 5. Microondas. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ramos, Luiz Pereira. III. Krieger, Nadia . IV. Título.

CDD: 665.37

TERMO DE APROVAÇÃO

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ÉSTERES ETÍLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS
ASSISTIDA POR IRRADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS

por


LAÍS PASTRE DILL

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de

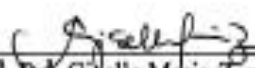
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,

pela Comissão Examinadora composta por:

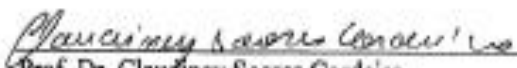
Orientador.



Prof. Dr. Lúcia Pereira Ramos
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Gisella Maria Zanin
Dep. de Engenharia Química - UEM



Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de agosto de 2015.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Anselmo Dill e Dione Maria Pastre Dill, a quem sou infinitamente grata pelo amor incondicional, carinho e incentivo em todos os momentos. Vocês são a fonte de inspiração para tudo que faço.

Ao meu irmão, Lucas Pastre Dill, que sempre me serviu como exemplo de persistência e dedicação e pelo apoio durante todos os momentos necessários.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luiz Pereira Ramos, pela dedicação, incentivo, paciência e diversos conhecimentos transmitidos ao longo deste período.

À Professora Dr^a. Nadia Krieger, pela coorientação e todos os conhecimentos transmitidos.

À minha amiga Débora Kochepka, não encontro palavras suficientes para te agradecer por todos os momentos dentro e fora do laboratório, pelo apoio nos momentos mais difíceis e palavras que me fizeram crescer.

Aos amigos Jonas Serres e Maritza A. Todo Bom, por estarem sempre prontos para um café, por todas as palavras que me ajudaram muito no decorrer do trabalho e a expandir meus conhecimentos dentro e fora do ambiente de estudos.

Aos meus amigos Douglas H. Fockink, Jacqueline Chimilovski e a amiga e aluna de Iniciação Científica Giovana S. Iamin, pela disposição em ajudar, por me ouvir quando necessário e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Polímeros, Thiago Alessandre da Silva e Grece Senhorini Sargi pelo suporte para o melhor entendimento de diversos aspectos relacionados à pesquisa e pelas conversas nos momentos de lazer.

Aos amigos e ex-companheiros do CEPESQ, Francis Baumgaardt e Fabiano Rosa da Silva por terem me acolhido na chegada e me ensinado muito do que sei.

Aos meus amigos de fora do ambiente acadêmico, Simone Dobner, Alice Schneider e Marcelo Maceno, por se fazerem presentes mesmo a muitos quilômetros de distância, entenderem minha ausência e continuarem a me motivar.

Aos colegas do Centro de Pesquisa em Química Aplicada (CEPESQ) e do Laboratório de Tecnologia Enzimática e Biocatálise (LTEB), pelo companheirismo e apoio nos momentos requeridos.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Leandro Piovan e Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro, pelas diversas contribuições que ajudaram no aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr^a. Gisella Zanin e Prof. Dr. Claudiney Soares Cordeiro, por aceitarem o convite e estarem dispostos a contribuir.

Ao Prof. Dr. Helton José Alves, que desde o início da graduação serviu como um modelo para seguir na vida acadêmica e por ter me ajudado a chegar aonde cheguei.

À Novozymes Latin América (Araucária – PR), pelo fornecimento das enzimas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade concedida.

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos, e aos demais órgãos de fomento à pesquisa: CNPq, FINEP e Fundação Araucária.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e acompanharam o meu progresso.

“A ciência é uma disposição de aceitar os fatos
mesmo quando eles são opostos aos desejos”.
(Burrhus Frederic Skinner)

RESUMO

O emprego de lipases como catalisadores na síntese de ésteres alquílicos de ácidos graxos (biodiesel) tem sido proposto como uma alternativa aos catalisadores químicos utilizados em processos industriais. Dentre as características que tornam interessante o uso de lipases nestes processos estão a sua biodegradabilidade e alta seletividade ao substrato, o que repercute em menor geração de efluentes. No entanto, estes biocatalisadores apresentam baixas taxas reacionais e para viabilizar a produção de biodiesel enzimático é preciso utilizar métodos de intensificação de reações, como a irradiação de micro-ondas. No presente trabalho, as lipases de *Candida antarctica* B livre e imobilizada (Novozym 435) foram empregadas na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) em dois diferentes sistemas de aquecimento, convencional e de micro-ondas. As lipases foram caracterizadas quanto ao seu conteúdo de proteínas totais e quanto a suas atividades catalíticas, que demonstraram que a lipase imobilizada tem menor quantidade de proteínas e comportamento distinto da CalB livre quando estas se encontram em diferentes ambientes químicos. A avaliação dos parâmetros reacionais para a síntese de EEAG catalisada pela CalB livre foi realizada primeiramente através de um estudo univariado, que demonstrou que o teor de água é relevante na regulação da atividade enzimática e que a razão molar etanol:óleo é um parâmetro que necessita ser cuidadosamente otimizado, a fim de minimizar a produção de ácidos graxos livres (AGL). Ademais, a adição de 10% de hexano neste sistema levou à diminuição na produção de ésteres. Posteriormente, um planejamento multivariado contendo as variáveis razão molar etanol:óleo, quantidade de enzima e teor de água foi realizado e este revelou um efeito negativo da razão molar sobre a produção de EEAG e de AGL. Outro planejamento fatorial contendo as mesmas variáveis foi empregado para o estudo da etanólise catalisada pela lipase imobilizada e este confirmou os diferentes comportamentos das lipases nestas reações. Neste caso, a água apresentou um efeito negativo e o teor de enzima um efeito positivo sobre os teores de EEAG obtidos e, além disso, a interação de razão molar e água exibiu um efeito positivo, demonstrando que a lipase imobilizada é mais tolerante ao etanol. As análises estatísticas apontaram a validade dos modelos desenvolvidos para descrever os sistemas reacionais para ambas as lipases sob aquecimento convencional. Quanto ao aquecimento por micro-ondas, este demonstrou não ser adequado para o uso da lipase imobilizada. Já nas reações catalisadas pela lipase livre, um estudo multivariado permitiu a obtenção de um teor em ésteres de 61,6% com o emprego da razão molar de 3:1, 3% de enzima (m m^{-1}) e 20,3% de água (m m^{-1}) em apenas 1 h sob irradiação de micro-ondas. Neste sistema, a razão molar também apresentou um expressivo efeito negativo sobre as reações de etanólise e de hidrólise. Os modelos gerados para descrever as respostas em teores de AGL e de EEAG também foram validados estatisticamente para uso da lipase livre sob micro-ondas. Posteriormente, comprovou-se que em 15 min é obtido um produto com o mesmo teor de EEAG e com o teor de AGL 3 p.p. menor do que o alcançado em 1 h. Além disso, as temperaturas de 50 °C e 70 °C não provocaram aumento nos teores de ésteres obtidos nas mesmas condições, mas a 70 °C o teor de AGL foi inferior ao conseguido a 40 °C. Por fim, foi comprovada a possibilidade de reuso da lipase livre em reações de síntese de ésteres sob aquecimento convencional e de micro-ondas. Portanto, este trabalho demonstrou a viabilidade do uso de micro-ondas para acelerar a etanólise catalisada por CalB livre em sistemas livres de solventes. Além disso, foi possível reutilizar a lipase, o que contribui para a viabilidade econômica do processo. Todavia, o teor de AGL do produto final ainda é um inconveniente a ser contornado.

Palavras-chave: ésteres etílicos, etanólise, CalB, Novozym 435, micro-ondas.

ABSTRACT

The use of lipases as catalysts for the synthesis of fatty acid alkyl esters (biodiesel) has been proposed as an alternative to the traditional chemical conversion technologies. In general, the use of lipases is attractive because of its biodegradability and high selectivity to the reaction substrate, which can be advantageous because it leads to a lower generation of effluent streams. However, these biocatalysts are costly and usually present low reaction rates. Hence, reaction intensification methods such as microwave irradiation have been investigated to facilitate the development of an enzyme-mediated biodiesel production process. In the present study, free and immobilized (Novozym 435) *C. antarctica* B lipases were employed in the synthesis of fatty acid ethyl esters (FAEE) using two different heating systems, conventional and based on microwave irradiation. Both lipases were characterized with regard to their total protein content and catalytic performance on model compounds. The immobilized CalB had a lowest protein content and a distinct behavior compared to free CalB under different chemical environments. The synthesis of FAEE with free CalB was initially evaluated through an univariate study, demonstrating that the total water content of the reaction medium was the most relevant parameter for determining reaction efficiency and that the ethanol:oil molar ratio is a parameter that needs to be carefully optimized in order to minimize the release of free fatty acids (FFA). Moreover, the addition of 10% *n*-hexane to the reaction system led to a decrease in the total FAEE production. Afterwards, a multivariate experimental design was performed having the ethanol:oil molar ratio, the enzyme concentration, and the water content as process variables. This experimental design showed that the molar ratio has a negative effect on both FAEE and FFA production. Another factorial design with the same variables was employed to study the performance of the immobilized lipase in the ethanolysis of soybean oil and this confirmed that these enzymes are characterized by a totally different catalytic behavior. In this case, water presented a negative and enzyme loading had a positive effect on the FAEE contents of the final reaction products. Furthermore, the interaction between molar ratio and water showed a positive effect, demonstrating that the immobilized lipase is more tolerant to ethanol. Mathematical models were developed to demonstrate the statistical validation of the reaction systems that were carried out with both lipases under conventional heating. However, the use of microwave heating was proved inadequate as a heating source for the immobilized lipase. For free lipase reaction systems, the best condition of the multivariate study resulted in a product with 61,6% total ester content and this include the use of an ethanol:oil molar ratio of 3:1, 3 wt% of enzyme and 20,3 wt% of water in only 1 h under microwave irradiation. In this system, the molar ratio also showed an expressive negative effect on both ethanolysis and hydrolysis. Moreover, the models created to predict both FFA and FAEE contents were statistically validated. The same results in FAEE were obtained when the reaction time was decreased to 15 min but the FFA content of the final product was 3.3 p.p. lower than that obtained in 1 h. Higher temperatures of 50 °C and 70 °C did not improve the observed FAEE content but at 70 °C the FFA content decreased in 3 p.p. in relation to reactions carried out 40 °C. At last, the reuse of the free lipase for ester synthesis was demonstrated under conventional and microwave heating. In conclusion, the benefits of using microwave heating to accelerate the free CalB catalyzed ethanolysis of soybean oil in an organic solvent-free system were demonstrated. Moreover, it was possible to reuse the free lipase and this contributes to the economic feasibility of the process. Nevertheless, the FFA content of the final product is still a drawback to be overcome.

Key-words: ethyl esters, ethanolysis, CalB, Novozym 435, microwave.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estequiometria da reação de transesterificação de triacilgliceróis com etanol para a produção de ésteres etílicos.	23
Figura 2. Produção <i>in situ</i> de íons metóxido.	24
Figura 3. Reação de hidrólise de ésteres.....	24
Figura 4. Mecanismo da reação de transesterificação homogênea básica.....	25
Figura 5. Mecanismo sugerido para a reação de saponificação de ácidos graxos livres por hidróxido de sódio.	26
Figura 6. Mecanismo da reação de transesterificação homogênea ácida.	27
Figura 7. Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos livres.	28
Figura 8. Modelo estrutural de α/β hidrolases.	31
Figura 9. Representação em fitas da estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i> B com ênfase no seu sítio catalítico.	32
Figura 10. Mecanismo de hidrólise de ésteres catalisado por lipases.	33
Figura 11. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados do óleo de soja refinado: (1) palmitato, (2) estearato, (3) oleato, (4) linoleato, (5) araquidonato, (6) padrão interno, (7) eicoseinato, (8) behenato, (9) linolenato, e (10) tricosenoato de metila.	57
Figura 12. Efeito da adição de água sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em 8 h de reação.	62
Figura 13. Monitoramento da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre com 10,3% de água adicionada no meio de reação.	63
Figura 14. Distribuição nas fases orgânica e aquosa da glicerina formada na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre com 10,3% de água adicionada ao meio.	64
Figura 15. Efeito da utilização de 10% de hexano sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre na presença de 10,3% de água.....	65
Figura 16. Efeito da razão molar etanol:óleo sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em 8 h de reação.	66
Figura 17. Diagrama de Pareto para a resposta expressa em (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres das variáveis estudadas para a etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre.....	69
Figura 18. Superfície de resposta da etanólise catalisada pela lipase livre sob aquecimento convencional para a relação razão molar etanol:óleo <i>versus</i> água (% m m ⁻¹), com os resultados expressos em (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres.	70
Figura 19. Efeito da variação do teor de água e razão molar etanol:óleo de 4:1 sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em 8 h de reação.	71

Figura 20. Diagrama de Pareto das variáveis estudadas na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase imobilizada, com a resposta expressa em teor de ésteres etílicos do produto final.	74
Figura 21. Superfície de resposta dos fatores enzima (% m m ⁻¹) <i>versus</i> água (% m m ⁻¹) para os resultados expressos como teor de ésteres para o planejamento experimental da etanólise catalisada pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional.	75
Figura 22. (A) Enzima Novozym 435 antes do uso, (B) meio de reação após 8 h de reação catalisada pela enzima imobilizada sob irradiação de micro-ondas (fase inferior: concentração do suporte desestruturado).	78
Figura 23. Diagrama de Pareto para a resposta expressa em (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres das variáveis estudadas para a etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas.	81
Figura 24. Superfície de resposta dos fatores razão molar etanol:óleo <i>versus</i> água (% m m ⁻¹) para os resultados expressos como (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres para o planejamento experimental da etanólise catalisada pela lipase livre em micro-ondas.	82
Figura 25. Acompanhamento das reações de etanólise catalisadas pela lipase livre sob aquecimento convencional e de micro-ondas, realizadas nas condições de melhor resposta para a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos.	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Delineamento experimental 2 ³ para etanólise de óleo de soja catalisada pela lipase livre sob aquecimento convencional.	48
Tabela 2. Delineamento experimental 2 ³ para etanólise de óleo de soja catalisada pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional.....	49
Tabela 3. Delineamento experimental 2 ³ para etanólise de óleo de soja catalisada pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas.	51
Tabela 4. Análise de parâmetros físicos e químicos do óleo de soja refinado.	55
Tabela 5. Descrição dos ácidos graxos observados no perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados do óleo de soja refinado.....	56
Tabela 6. Atividades enzimáticas das lipases livre e imobilizada.	59
Tabela 7. Respostas expressas em teor de ésteres etílicos e de ácidos graxos livres obtidos para o planejamento experimental multivariado para a etanólise catalisada pela lipase livre.....	67
Tabela 8. Parâmetros estatísticos obtidos pela análise de variância (ANOVA) das respostas expressas em teor de ésteres etílicos e teor de ácidos graxos livres do planejamento experimental multivariado, elaborado para a etanólise catalisada pela lipase livre sob aquecimento convencional.	68
Tabela 9. Teor de ésteres etílicos obtidos pela etanólise catalisada pela lipase imobilizada nas condições delineadas pelo planejamento experimental multivariado.	73
Tabela 10. Parâmetros estatísticos obtidos por análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial elaborado para a etanólise catalisada pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional, tendo a resposta expressa em teor de ésteres etílicos do produto final.	74
Tabela 11. Teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres obtidos em reações de etanólise catalisadas pela lipase livre sob aquecimento convencional e de micro-ondas, empregando 1 h de reação.	79
Tabela 12. Parâmetros estatísticos obtidos pela análise de variância (ANOVA) das respostas expressas em teores de ésteres etílicos e de ácidos graxos livres do planejamento experimental multivariado, elaborado para a etanólise catalisada pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas.	80
Tabela 13. Respostas expressas como teores de ésteres e de ácidos graxos livres obtidos para as reações de etanólise catalisadas pela lipase livre em diferentes temperaturas sob irradiação de micro-ondas.	85
Tabela 14. Respostas expressas como teores de ésteres e de ácidos graxos livres para as reações de reuso da lipase livre sob aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas.....	87
Tabela 15. Composição das fases orgânicas e aquosas obtidas após reação nas melhores condições sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas.....	88

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGL – Ácidos Graxos Livres

ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ANOVA – Análise de Variância Simples

AOCS – *American Oil Chemists' Society*

Asp – Aspartato

CalB – Lipase de *Candida antarctica* B

CalB L – Lipase comercial de *Candida antarctica* B na forma livre

CG – Cromatografia de Fase Gasosa

CLAE – Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

CPG – Cromatografia de Permeação em Gel

DAG – Diacilglicerol

DIC – Detector de Ionização por Chama

DMSO – Dimetilsulfóxido

EEAG – Éster Etílico de Ácido Graxo

EN – *European Normalization*

ENZ – Porcentagem de Enzima

ATR-FTIR – *Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

Glu – Glutamato

His – Histidina

I.A. – Índice de Acidez

I.S. – Índice de Saponificação

IUBMB – *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

MM – Massa Molar

mmol – Milimol

MAG – Monoacilglicerol

OSR – Óleo de soja refinado

p.p. – pontos percentuais

p.c. – ponto central do planejamento multivariado

PNPB – Programa Nacional Produção e Uso de Biodiesel

PROALCOOL – Programa Nacional do Alcool

PROBIODIESEL – Programa Brasileiro de Biodiesel

PRO-ÓLEO – Programa Nacional de Óleos Vegetais

RM – Razão Molar Etanol:Óleo

rpm – Rotações por Minuto

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*

Ser – Serina

TAG – Triacilglicerol

U – Unidade de Atividade Enzimática

V.R. – Valor Real

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Biodiesel: definição e propriedades	20
2.2. Biodiesel no Brasil	21
2.3. Álcoois geralmente empregados na produção de biodiesel.....	22
2.4. Rotas catalíticas de produção de biodiesel	24
2.4.1. Catálise química homogênea	24
2.4.2. Catálise química heterogênea	28
2.4.3. Catálise enzimática.....	30
2.4.3.1. Lipases	30
2.4.3.2. Catálise enzimática para a produção de ésteres graxos.....	35
2.5. Micro-ondas.....	37
2.5.1. O uso de micro-ondas em catálise enzimática.....	39
3. OBJETIVOS	42
3.1. Objetivo Geral	42
3.2. Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1. Materiais.....	43
4.2. Metodologia Experimental.....	43
4.2.1. Caracterização da matéria-prima	43
4.2.2. Determinação do perfil cromatográfico da matéria-prima	44
4.2.3 Determinação de proteínas totais nas lipases livre e imobilizada.....	44
4.2.3.1. Procedimentos utilizados para a lipase livre.....	44
4.2.3.2. Procedimentos utilizados para a lipase imobilizada.....	45
4.2.3.3. Dosagem de proteínas totais pelo método do ácido bicinonínico	45
4.2.4. Atividade de esterificação em meio orgânico	45
4.2.5. Atividade de hidrólise em meio aquoso	46
4.2.6. Atividade de hidrólise em meio orgânico	47
4.2.7. Síntese enzimática de ésteres de etila pela lipase livre sob aquecimento convencional.....	47
4.2.8. Estudos multivariados da síntese de ésteres etílicos pelas lipases livre e imobilizada sob aquecimento convencional	48
4.2.9. Síntese de ésteres etílicos pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas	50

4.2.10. Reuso da lipase livre na síntese de ésteres etílicos sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas.....	51
4.2.11. Cromatografia de permeação em gel e cromatografia a gás para análise dos ésteres alquílicos	52
4.2.12. Determinação de glicerol e etanol	53
4.2.13. Análise estatística dos estudos univariados e multivariados	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Caracterização da matéria graxa	55
5.2. Determinação das atividades de hidrólise e síntese de ésteres das lipases de Candida antarctica B.....	57
5.3. Síntese de ésteres de etila pela lipase livre sob aquecimento convencional.....	61
5.3.1. Efeito da água na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em sistema livre de solventes.....	61
5.3.2. Efeito do solvente (hexano) na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre.....	64
5.3.3. Efeito da razão molar etanol:óleo na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em sistema livre de solventes.....	65
5.4. Pré-otimização multivariada da síntese de ésteres etílicos pela lipase livre sob aquecimento convencional	66
5.5. Otimização da razão molar etanol:óleo e do teor de água na síntese de ésteres etílicos pela lipase livre sob aquecimento convencional	71
5.6. Pré-otimização multivariada da síntese de ésteres etílicos pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional	72
5.7. Pré-otimização da síntese de ésteres etílicos pelas lipases livre e imobilizada sob aquecimento de micro-ondas	77
5.8. Reuso da lipase livre na síntese de ésteres etílicos sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas	86
6. CONCLUSÃO.....	89
7. REFERÊNCIAS.....	91

1. INTRODUÇÃO

Os combustíveis fósseis são atualmente os mais utilizados para suprir a demanda mundial de energia. No entanto, atualmente há uma grande preocupação com o esgotamento de suas fontes e com o aumento no preço destes combustíveis. Além disso, são fontes energéticas não renováveis que têm sido associadas a problemas ambientais, como a emissão de gases poluentes relacionados às mudanças climáticas. Tais fatores têm motivado a utilização de combustíveis alternativos que sejam renováveis e ambientalmente corretos como, por exemplo, o biodiesel (CHRISTOPHER *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2014; GULDHE *et al.*, 2015).

O biodiesel é uma mistura de monoésteres de alquila produzidos a partir de fontes renováveis como óleos e gorduras e a escolha da matéria-prima para a sua produção depende de seu custo e disponibilidade em determinada região. Nas últimas décadas, os ésteres graxos têm se destacado por sua capacidade de serem utilizados como combustível em motores do ciclo diesel. Tal utilização apresenta como principal vantagem o fato de não contribuir significativamente ao aumento nas emissões de CO₂, que é considerado um gás do efeito estufa, uma vez que a quantidade de CO₂ liberada na atmosfera pela sua combustão é praticamente a mesma que é absorvida pela fotossíntese das plantas oleaginosas durante o seu crescimento. No entanto, alguns estudos relatam a maior emissão de óxidos de nitrogênio (NO_x) durante o uso de biodiesel, quando comparado ao uso de diesel mineral e, ainda, um alto custo do produto, o que está relacionado principalmente à matéria-prima, uma vez que esta representa 60-90% do seu custo de produção (KNOTHE *et al.*, 2006; SANTORI *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2014).

A produção industrial dos ésteres graxos é realizada, principalmente, através da metanólise ou transesterificação metílica. O metanol é usualmente empregado para este fim devido às suas vantagens técnicas e econômicas, já este que apresenta alta reatividade e baixa solubilidade no meio de reação, facilitando a obtenção do produto. Todavia, o emprego de etanol é mais atrativo do ponto de vista ambiental, já que este pode ser produzido a partir de recursos renováveis e seus ésteres apresentam melhores propriedades combustíveis em relação aos ésteres metílicos, justificando a motivação para seu uso (KNOTHE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2013a).

Na indústria são utilizados catalisadores alcalinos para acelerar a metanólise de óleos e gorduras, que é realizada em meio homogêneo (ou seja, não há fases distintas entre o catalisador e os reagentes). Esta rota tem sido empregada em virtude das altas taxas de conversão obtidas em curto tempo de reação, baixo custo do catalisador e uso de condições moderadas de temperatura durante a conversão. Entretanto, este processo é comprometido pelos teores de

água e de ácidos graxos livres eventualmente presentes na matéria-prima, que favorecem a reação de saponificação resultando em consumo de parte do catalisador e menores rendimentos do produto final. Além disso, o emprego deste método requer etapas subsequentes de purificação que incluem a remoção do catalisador e a recuperação do produto em qualidade compatível com as especificações vigentes, gerando efluentes que necessitam de tratamento e por isto geram um custo adicional ao processo (KUSDIANA e SAKA, 2004; AGUIEIRAS *et al.*, 2014; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

Na busca por um processo de produção de biodiesel mais ambientalmente correto, o uso de catalisadores enzimáticos (lipases) tem se destacado devido à biodegradabilidade do catalisador e a ausência de reações paralelas como a saponificação, o que diminui a produção de efluentes. Ademais, a glicerina gerada a partir da rota enzimática é recuperada com elevada qualidade, porque nela não estão contidos metais (resíduos de catalisadores químicos) e sais de ácidos graxos (sabão) como no processo convencional de catálise alcalina. Desta forma, o coproduto possui maior valor agregado e pode ser empregado em indústrias alimentícias e farmacêuticas (VYAS *et al.*, 2010; VÉRAS *et al.*, 2011; GULDHE *et al.*, 2015).

Processos biocatalíticos possuem diversas vantagens em relação aos químicos, porém seu uso é limitado por fatores como o longo tempo de reação e o alto custo das enzimas. A maioria dos estudos de produção de biodiesel enzimático tem empregado lipases imobilizadas, como a enzima comercial Novozym 435 (que é a lipase de *C. antarctica* B imobilizada em Lewatit VP OC 1600). No entanto, a viabilidade econômica de sua aplicação depende do reuso do catalisador por vários ciclos de reação, porque o suporte e o procedimento de imobilização encarecem o processo. Neste sentido, trabalhos recentes têm demonstrado que as formulações de lipases livres podem ser uma opção mais competitiva economicamente, uma vez que estas são significativamente mais baratas que seus homólogos imobilizados (NIELSEN *et al.*, 2008; BAJAJ *et al.*, 2010; PEDERSEN *et al.*, 2014).

Outro fator que inviabiliza o emprego de lipases na produção de biodiesel são os longos tempos de reação requeridos para atingir altas conversões. Neste caso, as baixas taxas de reação podem ser superadas pelo uso de técnicas de intensificação de reações, como o aquecimento por irradiação de micro-ondas. Esta técnica apresenta vantagens em relação aos métodos de aquecimento convencional, como a absorção de energia de forma mais efetiva pelos reagentes. A irradiação de micro-ondas tem apresentado um efeito positivo sobre a velocidade de reações catalisadas por lipases imobilizadas, entretanto, estudos a respeito do uso de lipases livres nestes sistemas para a síntese de ésteres graxos ainda foram pouco explorados. Além disso, a investigação de reações realizadas na ausência de solventes torna o processo mais viável

economica e ambientalmente (REJASSE *et al.*, 2004; NOGUEIRA *et al.*, 2010; DA RÓS *et al.*, 2012; YADAV e THORAT, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biodiesel: definição e propriedades

O biodiesel é composto por uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia carbônica longa (C14-C20) que pode ser produzida, principalmente, através da alcoólise de triacilgliceróis ou pela esterificação de ácidos graxos livres, empregando álcoois mono-hidroxilados de cadeia curta (C1-C4), idealmente na presença de um catalisador (químico ou enzimático). Este biocombustível representa uma alternativa ao petrodiesel com os benefícios de ser derivado de matérias-primas renováveis e biodegradável. No entanto, para que os ésteres produzidos possam ser comercializados como biodiesel, esta mistura necessita atender a normas específicas de qualidade que, no Brasil, são regulamentadas pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), através da sua Resolução ANP nº 45/2014 (KNOTHE *et al.*, 2006; ANP, 2014; GUO *et al.*, 2015).

Apesar da variação de suas propriedades específicas de acordo com a matéria-prima, o biodiesel apresenta algumas vantagens genéricas de grande importância em relação ao diesel mineral, como é o caso do seu alto teor de oxigênio, que promove uma combustão mais completa no motor, reduzindo a emissão de particulados. Além disto, o biodiesel possui maior número de cetano, o que lhe confere maior qualidade na ignição, tem elevado ponto de fulgor (110-190 °C), que garante maior segurança no transporte, manuseio e armazenamento, e é menos tóxico, possuindo baixos teores de enxofre e de compostos aromáticos (GRABOSKI e MCCORMICK, 1998; KNOTHE *et al.*, 2006; GUO *et al.*, 2015).

Diversos autores têm relatado que, em relação ao diesel mineral, o emprego do biodiesel gera reduções expressivas nas emissões de CO, reduz ou elimina a liberação de compostos de enxofre e a propicia a quase total reabsorção das emissões de CO₂. Todavia, observou-se em alguns casos o aumento na emissão dos óxidos de nitrogênio (NO_x) (BASHA *et al.*, 2009; SANTORI *et al.*, 2012).

Além das vantagens ambientais, o uso de biodiesel poderia ser reponsável pela redução da dependência de países como o Brasil da importação de petróleo. Portanto, devido a crescente demanda por energias alternativas, a produção de biodiesel tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Por outro lado, o custo da produção deste biocombustível ainda é elevado, tornando-o pouco competitivo em relação ao diesel mineral, sendo que a maior contribuição para o seu preço é proveniente do custo da matéria-prima. Assim, são necessários esforços em relação ao desenvolvimento de tecnologias mais eficientes para a obtenção de biodiesel e de

ajustes nas condições de operação que permitam o alcance de maiores taxas de produção com redução de custos intrínsecos ao sistema produtivo, levando a um aumento das possibilidades de aplicação prática do processo (BAJAJ *et al.*, 2010; HAMA e KONDO, 2013; ULLAH *et al.*, 2015).

2.2. Biodiesel no Brasil

No final de 1970, a crise do petróleo promoveu a criação de programas que estimularam a diminuição do uso de derivados de petróleo. Um destes programas foi denominado de PROALCOOL e tinha como objetivo a adição de etanol anidro à gasolina ou a substituição desta por etanol hidratado. Outro programa lançado foi o PRO-ÓLEO, que tinha a meta de utilizar misturas de até 30% de óleos vegetais no diesel mineral e, na mesma época, a transesterificação de óleos vegetais também foi proposta como uma alternativa. No entanto, a implantação do PRO-ÓLEO não foi tão bem sucedida como a do PROALCOOL porque as soluções para motores do ciclo Otto eram mais urgentes e estratégicas do que aquelas para motores do ciclo diesel. Além disso, em 1986, os preços internacionais do petróleo decresceram, o que reduziu o incentivo à expansão de programas desta natureza (POUSA *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2011; RICO e SAUER, 2015).

Em 2002, outro projeto nacional visando a substituição do diesel de petróleo foi iniciado. Com este programa, chamado de PROBIODIESEL, a etanolíse de óleos vegetais foi considerada a principal rota de conversão. Entretanto, com a transição no Governo Federal, este programa foi readequado para a inclusão (e priorização) da agricultura familiar como seu principal objetivo. Dessa forma, em 2004, foi proposto o Programa Nacional para a Produção de Biodiesel – PNPB, cujos princípios incluíam o incentivo a produção de biodiesel a partir de oleaginosas oriundas de famílias de agricultores e, desde então, o programa vem sendo gradativamente implementado no país (POUSA *et al.*, 2007; RICO e SAUER, 2015).

A aquisição do biodiesel produzido no Brasil é realizada somente através de leilões organizados pela Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a fim de estimular o investimento na produção e comercialização do produto. Ademais, os leilões têm como intuito estruturar a mistura antecipada de biodiesel com o petrodiesel, que, atualmente, é uma condição obrigatória para a comercialização de diesel no país. Estas adições de biodiesel ao diesel mineral tiveram início no ano de 2005, porém somente começaram a ser compulsórias em janeiro de 2008, inicialmente no percentual de 2% (B2) que chegou a 5% no ano de 2010. Já em 2014, a Lei 13.033 tornou definitivo o aumento da mistura de biodiesel ao óleo diesel

para 6% a partir de 1º de julho e para 7% a partir de 1º de novembro, demonstrando a crescente importância desta cadeia de produção para o desenvolvimento político e tecnológico do Brasil (ANP, 2014; RICO e SAUER, 2015).

Atualmente existem 57 plantas produtoras de biodiesel autorizadas pela ANP, o que corresponde a uma capacidade total autorizada de 20606,51 m³ dia⁻¹. De acordo com o Boletim Mensal do Biodiesel, a produção brasileira no mês de abril de 2015 utilizou em média 77,6% de óleo de soja, 18,0% de gordura bovina, 0,8% de óleo de algodão e 3,6% de outros materiais graxos, revelando que a soja ainda é a matéria-prima mais utilizada (ANP, 2015).

Rico e Sauer (2015) concluíram que com o PNPB, durante o período de 2005-2014, o biodiesel produzido representou 2,7% do diesel consumido e 20% do diesel importado, evitando gastos de 11 bilhões de dólares em importações para o Brasil. Além disso, o contínuo aumento da proporção de biodiesel misturado ao diesel tem oferecido grandes benefícios ambientais, como a redução das emissões de gases de efeito estufa, garantindo melhor qualidade do ar. No entanto, do ponto de vista social, nota-se que o favorecimento de agricultores familiares envolvidos na produção de matéria-prima exige ainda mais apoio, visando oferecer mais incentivo econômico para a diversificação no cultivo de oleaginosas de cultivo e crescimento mais sustentável.

2.3. Álcoois geralmente empregados na produção de biodiesel

Os álcoois mais comumente utilizados na produção de ésteres graxos (biodiesel) são o metanol e o etanol. A proposta inicial do PROBIODIESEL (depois PNPB) era de adicionar ao diesel mineral um biodiesel composto por ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG). Porém, o uso de etanol continua a apresentar algumas barreiras tecnológicas, fazendo com que o metanol seja atualmente o mais amplamente utilizado. Uma limitação é o fato de o etanol agir como cossolvente em misturas óleo/éster/glicerina e, assim, exigir operações unitárias mais complexas para promover a separação dos produtos. Além disso, a formação de misturas azeotrópicas entre etanol e água dificulta a recuperação do excesso de etanol empregado nas reações, o que repercute em gastos dispendiosos (KUCEK *et al.*, 2007; POUSA *et al.*, 2007; DOMINGOS *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2011).

As estruturas moleculares do etanol e do metanol diferem apenas por um grupamento metileno a mais, o que leva ao aumento do poder calorífico e no número de cetano dos ésteres etílicos, melhorando a qualidade da ignição do combustível. Ainda, os ésteres etílicos apresentam pontos de névoa, de entupimento de filtro a frio e de fluidez mais baixos em relação

aos ésteres metílicos, características importantes em relação ao uso de biodiesel em condições de inverno mais rigorosas e à necessidade do uso de aditivos que visam melhorar as propriedades de fluxo a frio do combustível (ENCINAR *et al.*, 2007; MENDOW *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013a).

A maior cadeia carbônica do etanol, no entanto, leva à diminuição da reatividade deste em comparação ao metanol devido a efeitos de impedimento estérico, o que implica no uso de maiores razões molares e tempos de reação mais longos. O metanol também apresenta maior polaridade, o que garante uma melhor separação entre a fase glicerínica e os ésteres graxos, facilitando as etapas de recuperação ao término da reação. No entanto, o uso de metanol em plantas industriais prevalece não apenas por razões técnicas, mas, também, por questões financeiras, já que o etanol é mais caro e a etanolise exige maior investimento de capital (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; DEMIRBAS, 2005; LI *et al.*, 2013a).

Em uma perspectiva econômica, o etanol apresenta uma importante vantagem, já que em razão da estequiometria da reação, o rendimento mássico possível de ésteres etílicos, definido como a razão mássica entre EEAG e TAG, pode chegar a um aumento em 5% da massa de biodiesel (Figura 1). Ademais, pode haver viabilidade econômica no uso deste álcool no Brasil pela abundância na produção de suas matérias-primas e pelas tecnologias de obtenção estarem bem estabelecidas, sugerindo que uma eventual demanda das indústrias de biodiesel seria facilmente suprida. O emprego de etanol ainda pode garantir a produção de um combustível 100% renovável, visto que este é proveniente de fontes renováveis enquanto que o metanol é altamente tóxico e majoritariamente derivado de atividades petroquímicas (KUCEK, 2004; ISSARIYAKUL *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2011; MOTASEMI e ANI, 2012; ADACHI *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2013a).

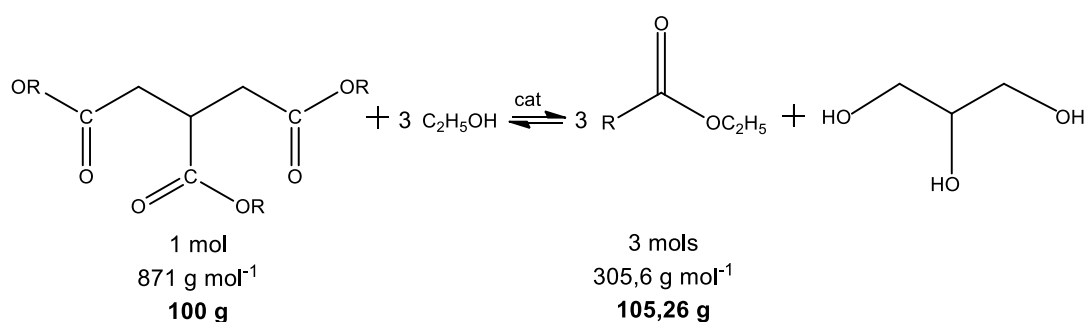


Figura 1. Estequiometria da reação de transesterificação de triacilgliceróis com etanol para a produção de ésteres etílicos.

Fonte: Kucek (2004).

2.4. Rotas catalíticas de produção de biodiesel

A produção de biodiesel por transesterificação ou esterificação é geralmente realizada na presença de um catalisador, que é uma substância que aumenta a velocidade de uma reação química, fornecendo-lhe um caminho alternativo de menor energia de ativação. Os catalisadores utilizados nestes processos podem ser de natureza química (alcalinos ou ácidos) ou enzimática e, dependendo desta escolha, as rotas da reação podem diferir em algumas de suas etapas (AL-ZUHAIR *et al.*, 2007).

2.4.1. Catálise química homogênea

A transesterificação consiste na reação entre ésteres e um álcool mono-hidroxilado, que resulta em uma mistura de ésteres alquílicos e glicerol. Industrialmente, utilizam-se catalisadores alcalinos homogêneos nesta reação, como os metóxidos de sódio ou potássio, que podem ser obtidos comercialmente em solução alcoólica anidra ou utilizando hidróxidos (NaOH ou KOH) para geração *in situ* dos alcóxidos correspondentes (Figura 2). No entanto, esta obtenção do catalisador leva à formação de água no meio, que pode provocar reações de hidrólise dos ésteres de glicerol e dos monoésteres produzidos (Figura 3) (RAMOS *et al.*, 2011).

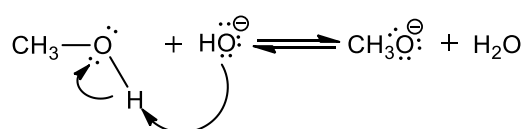


Figura 2. Produção *in situ* de íons metóxido.

Fonte: Ramos *et al.* (2011).

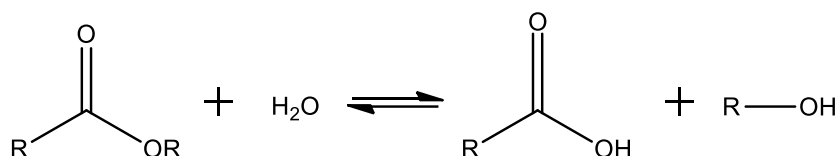


Figura 3. Reação de hidrólise de ésteres.

Fonte: A autora.

A Figura 4 apresenta o mecanismo da reação de transesterificação homogênea em meio alcalino. Na primeira etapa, o íon alcóxido faz um ataque nucleofílico ao carbono da carbonila do triacilglicerol. Na sequência, há formação de um intermediário tetraédrico que libera um

ânion alcóxido. Este ânion alcóxido se combina com o ácido conjugado da base (1ª etapa) quando uma molécula de diacilglicerol e uma molécula de éster alquílico são liberadas. Este processo envolve uma sequência de três reações consecutivas e reversíveis nas quais di- e monoacilgliceróis são formados como espécies intermediárias de reação, produzindo 3 mols de éster e 1 mol de glicerol para uma razão molar estequiométrica de 3:1 entre o álcool e o óleo. Porém, por tratar-se de uma reação reversível, o rendimento em ésteres depende do deslocamento do equilíbrio em favor dos produtos, que pode ser realizado através do emprego de um excesso estequiométrico do álcool (SCHUCHARDT *et al.*, 1998; MA e HANNA, 1999; POPPE *et al.*, 2015a).

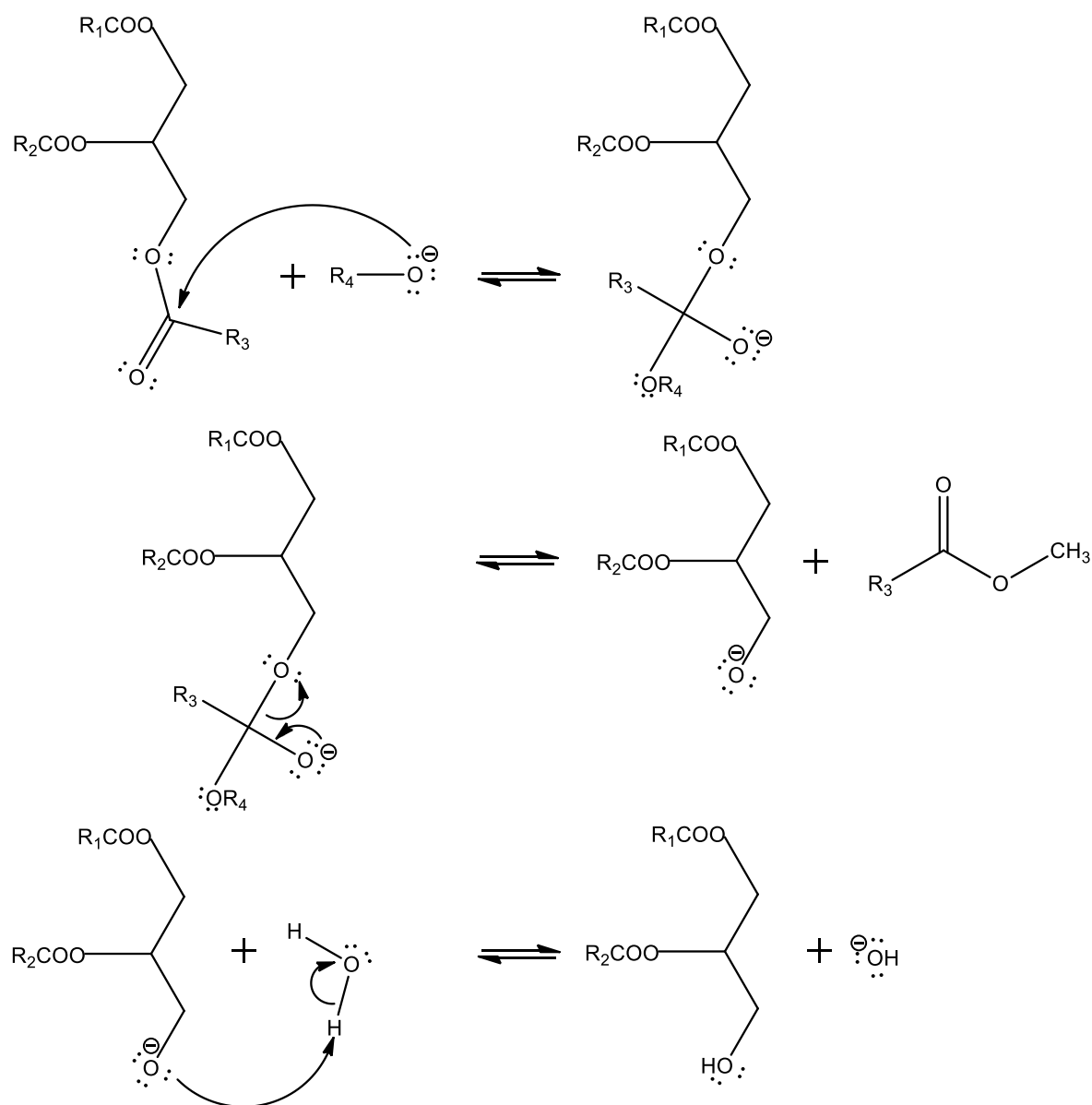


Figura 4. Mecanismo da reação de transesterificação homogênea básica.

Fonte: Schuchardt *et al.* (1998).

A transesterificação homogênea básica é comprometida pelos teores de água e de ácidos graxos livres ocasionalmente presentes no sistema reacional. Como já citado, a presença de água leva a reações de hidrólise e os ácidos graxos livres formados podem reagir com o catalisador básico formando sabões (Figura 5). Consequentemente, há um consumo parcial do catalisador, o que diminui os rendimentos da reação. Além disso, o emprego deste método requer etapas subsequentes de purificação, que incluem a quebra de emulsões formadas no meio e a remoção do excesso de catalisador que contamina os produtos da reação. Assim, a mistura de ésteres e a glicerina devem ser submetidas a processos de purificação que permitam a utilização do combustível em motores de ignição por compressão e, ainda, possibilitem o uso do coproduto em novas aplicações, agregando maior viabilidade econômica ao processo (KUSDIANA e SAKA, 2004; KNOTHE *et al.*, 2006; ABBASZADEH *et al.*, 2012; AGUIEIRAS *et al.*, 2014).

Ácidos de Brönsted-Lowry também podem ser utilizados como catalisadores em reações de alcoólise, tais como os ácidos sulfúrico, fosfórico e clorídrico. Estes catalisadores fornecem elevadas conversões em ésteres, porém, devido à menor velocidade da reação em relação aos processos alcalinos, requerem condições mais extremas de temperatura (próximo ao ponto de ebulição do álcool) e razões molares álcool:óleo mais altas (comumente 30:1). Além disso, podem ocasionar a corrosão dos reatores, havendo uma demanda por equipamentos mais resistentes, e gerar descartes de águas de lavagem, que são principalmente resultantes da reação de neutralização do excesso de catalisador (GERPEN, 2005; RAMOS *et al.*, 2011; ATADASHI *et al.*, 2013).

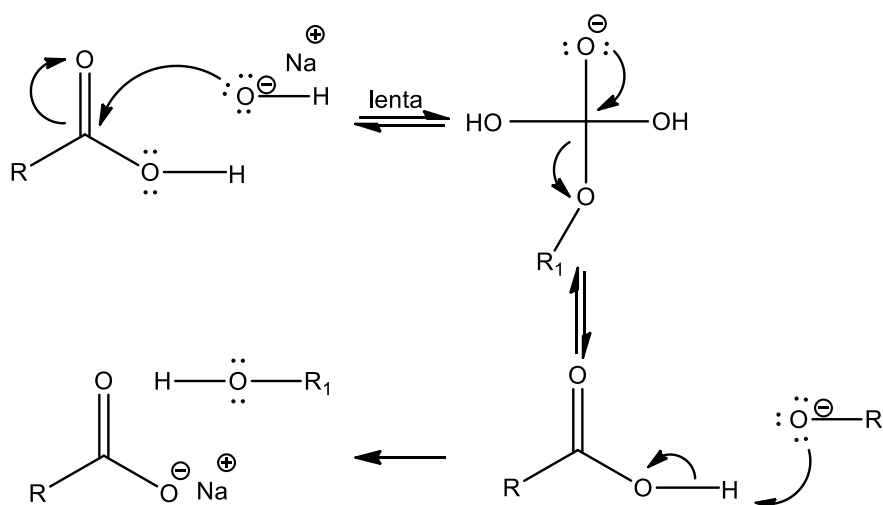


Figura 5. Mecanismo sugerido para a reação de saponificação de ácidos graxos livres por hidróxido de sódio.

Fonte: Schuchardt *et al.* (1998).

O mecanismo da reação de transesterificação catalisada por ácidos está ilustrado na Figura 6. Primeiramente ocorre a protonação do grupo carbonila do éster (TAG), levando à formação do carbocátion. Em seguida, este carbocátion sofre um ataque nucleofílico pelo álcool, o que leva à formação de um intermediário tetraédrico. Na próxima etapa este intermediário elimina uma molécula de éster alquílico e regenera o catalisador. É importante salientar que reações realizadas com catalisadores ácidos não são afetadas pela quantidade de ácidos graxos livres presentes no meio, pois estes podem ser facilmente esterificados (Figura 7) (SCHUCHARDT *et al.*, 1998).

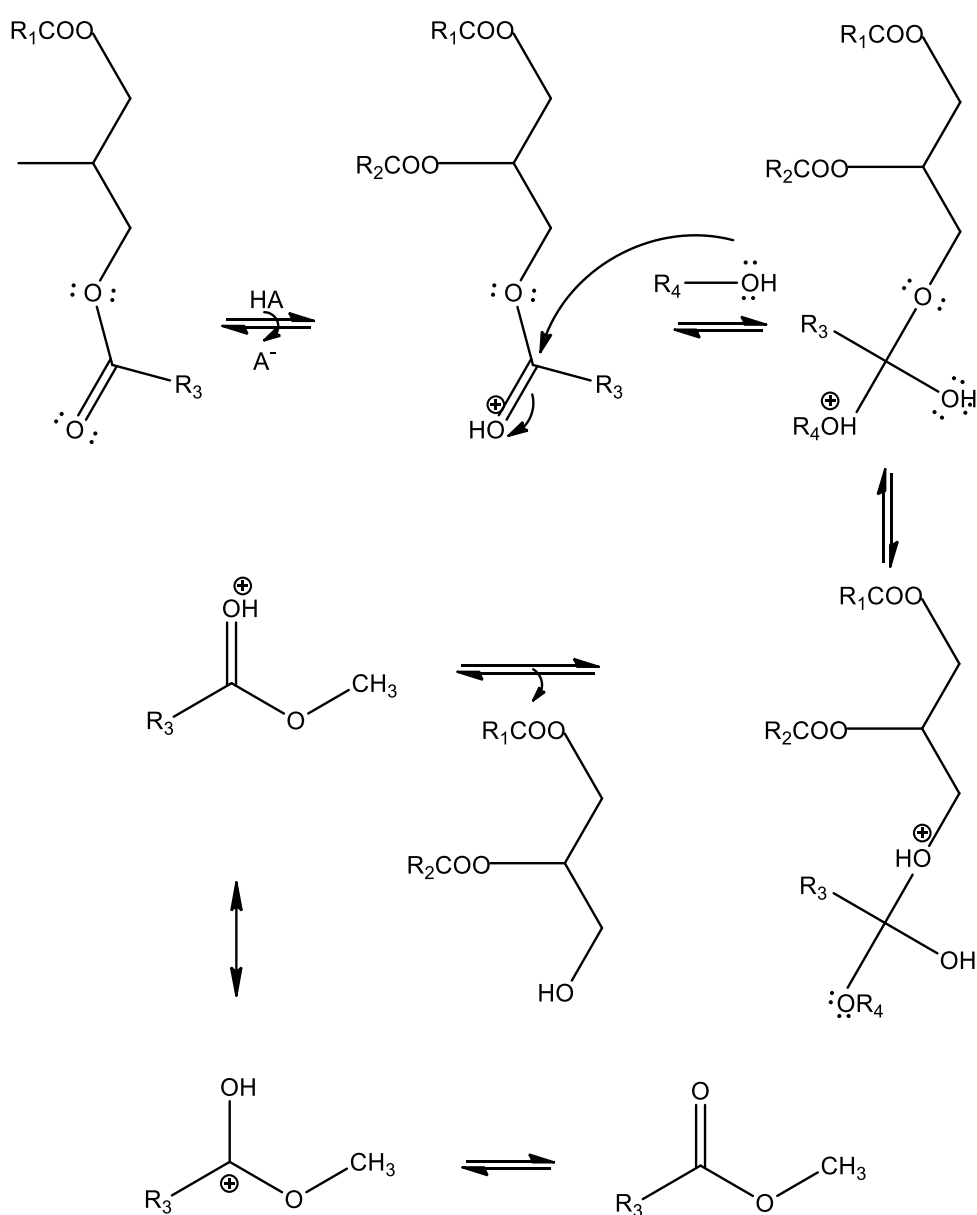


Figura 6. Mecanismo da reação de transesterificação homogênea ácida.

Fonte: Schuchardt *et al.* (1998).

Os catalisadores químicos homogêneos geralmente apresentam alguns inconvenientes como o fato de não poderem ser reutilizados, exigindo processos de purificação dos produtos obtidos e gerando resíduos que necessitam de tratamento. Ademais, nestes processos, a glicerina é obtida com baixa qualidade em consequência da possível presença de catalisador remanescente. No caso da transesterificação realizada com catalisadores básicos ainda podem ser gerados sabões, o que repercute no encarecimento do seu processo de purificação. Portanto, visando mitigar custos operacionais, a catálise heterogênea pode ser um procedimento alternativo, que idealmente facilita a purificação dos monoésteres obtidos, possibilita a reutilização do catalisador sólido e minimiza a geração de resíduos (BOEY *et al.*, 2012; GHESTI *et al.*, 2012).

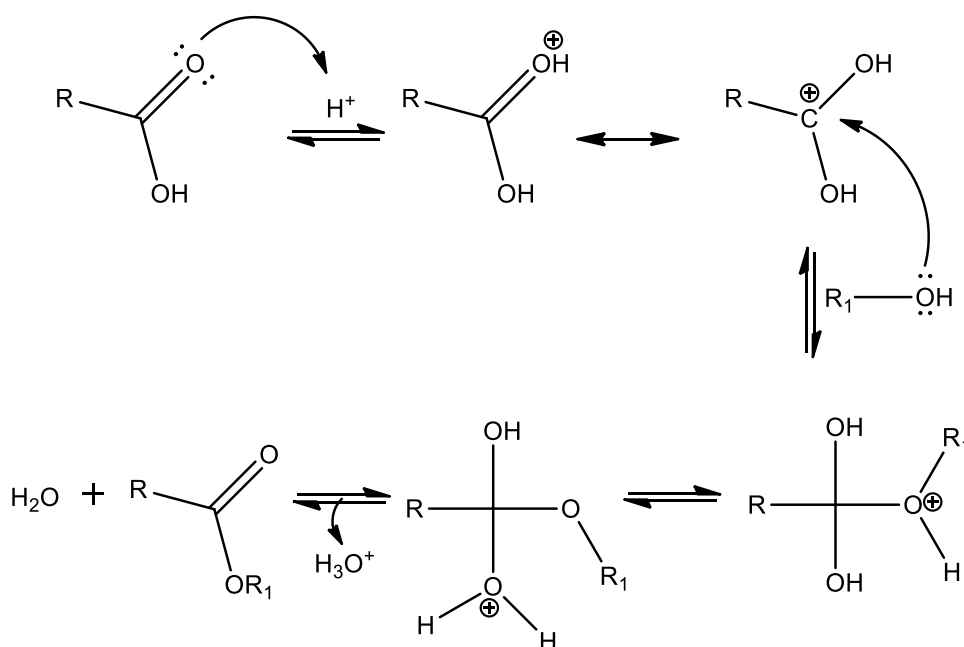


Figura 7. Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos livres.

Fonte: Schuchardt *et al.* (1998).

2.4.2. Catálise química heterogênea

Os processos heterogêneos de síntese de biodiesel podem apresentar vantagens técnicas, econômicas e ambientais em relação aos processos homogêneos porque o emprego de um catalisador sólido facilita as etapas de purificação do biodiesel e da glicerina, permite a reutilização do catalisador e diminui a geração de efluentes. Ademais, com o uso destes materiais é possível realizar reações em reatores de leito fixo que podem ser operados em modo

contínuo, acarretando em maior eficiência na transferência de massa e, conseqüentemente, aumentando a taxa da reação e a viabilidade do processo (CORDEIRO *et al.*, 2011; ISLAM *et al.*, 2013; ARANSIOLA *et al.*, 2014).

Para a catálise heterogênea, os catalisadores podem ser mássicos, em que toda a massa do material é constituída por substâncias ativas do ponto de vista catalítico, ou suportados, em que a fase ativa é dispersa em um suporte que pode ser ativo ou inativo. Dentre os catalisadores heterogêneos químicos mais estudados para a produção de biodiesel estão os que possuem sítios catalíticos de Lewis ou de Brönsted-Lowry. As espécies químicas que possuem sítios ácidos ou básicos de Lewis têm sua acidez ou basicidade geralmente associadas a sistemas não próticos que resultam da interação com metais, particularmente os metais de transição, enquanto que nas espécies contendo sítios ácidos ou básicos de Brönsted-Lowry, a lixiviação da espécie catalítica pode ser muito mais favorecida. Desta forma, catalisadores de Brönsted-Lowry perdem progressivamente sua atividade catalítica durante a reação, tornando impraticável o seu reuso por diversos ciclos de reação, fato bem menos recorrente no uso de catalisadores ácidos ou básicos de Lewis (DI SERIO *et al.*, 2008; CORDEIRO *et al.*, 2011).

Normalmente, os catalisadores heterogêneos básicos são mais ativos que os ácidos, sendo que os óxidos metálicos, como óxido de cálcio e óxido de magnésio, são as espécies catalíticas mais conhecidas. No entanto, estes possuem a desvantagem de serem afetados pelos teores de água e ácidos graxos livres da mesma forma que ocorre com os catalisadores homogêneos. Por exemplo, em reações realizadas com CaO já foi relatada a formação de sais de ácidos graxos (sabão). Além disso, este composto é solúvel em glicerina e a formação desta no meio reacional pode levar à solubilização do catalisador, tornando a catálise parcialmente homogênea. Portanto, o consumo do catalisador em reações de saponificação e sua solubilização no coproduto da reação diminuem a atividade catalítica e o rendimento em ésteres. Por outro lado, os catalisadores ácidos têm como vantagem mais evidente a sua habilidade de também catalisar as reações de esterificação de ácidos graxos livres (DABDOUB e BRONZEL, 2009; BORGES e DÍAZ, 2012).

Outra conveniência da catálise heterogênea ácida é o fato desta ser menos corrosiva, menos tóxica e provocar menores problemas ambientais em detrimento ao processo homogêneo ácido. Todavia, requer maiores temperaturas ($> 75\text{ }^{\circ}\text{C}$) e razões molares álcool:óleo. Além disso, estes catalisadores podem sofrer desativação por adsorção de compostos polares como o glicerol e a água, reduzindo a disponibilidade de sítios catalíticos ativos já que o acesso de reagentes hidrofóbicos a estes é restrito (ISLAM *et al.*, 2013; ARANSIOLA *et al.*, 2014; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

O tamanho das partículas dos catalisadores heterogêneos, tanto ácidos como básicos, também é bastante relevante, porque partículas extremamente pequenas podem dificultar a recuperação do material sólido e a purificação do produto de interesse. Ainda, no caso de catalisadores suportados, a distribuição dos sítios ativos pode não ser uniforme ou formar agregados localizados, diminuindo o contato destes com os reagentes. Portanto, as propriedades texturais do catalisador representam uma questão-chave para o desenvolvimento de novos catalisadores heterogêneos (ISLAM *et al.*, 2013).

Vários outros requisitos também precisam ser atendidos para aumentar o potencial catalítico de materiais sólidos para a produção de biodiesel, tais como alta área superficial por unidade de volume, alta seletividade as moléculas de interesse, possibilidade de reuso por diversos ciclos reacionais, alta estabilidade térmica e elevada resistência mecânica e ao desgaste por fricção. Neste sentido, avanços nas pesquisas nesta área ainda são necessários, com a finalidade de se obter sólidos catalíticos mais robustos e aumentar a viabilidade de sua aplicação. Além disso, alguns dos benefícios oferecidos pelos catalisadores químicos heterogêneos, como a capacidade de catalisar reações de transesterificação e de esterificação simultaneamente e a menor geração de efluentes, podem ser conseguidos com o uso de catalisadores enzimáticos, com a vantagem de a reação ser realizada em condições mais brandas de temperatura (CORDEIRO *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2014).

2.4.3. Catálise enzimática

2.4.3.1. Lipases

As lipases (E.C.3.1.1.3), denominadas hidrolases dos ésteres de glicerol, são enzimas que atuam naturalmente na interface lipídio/água, realizando a hidrólise de triacilgliceróis de cadeias curtas, médias e longas. No entanto, para que possam ser definidas como lipases, estas devem apresentar atividade contra triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono). Em sistemas reacionais aquorrestritos as lipases catalisam outras reações como esterificação, transesterificação e interesterificação. Estas reações ocorrem geralmente com elevada regio- e enantiosseletividade, o que torna as lipases um importante grupo de biocatalisadores (ZAKS e KLIBANOV, 1985; JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER *et al.*, 1999; IUBMB, 2015).

As lipases geralmente apresentam uma massa molecular de 19 a 60 kDa e, quanto a sua classificação, pertencem ao grupo das serina-hidrolases. Estas enzimas são constituídas por um

sítio ativo que contém uma tríade catalítica composta pelos resíduos dos aminoácidos serina, ácido aspártico (ou glutâmico) e histidina. As enzimas pertencentes a este grupo apresentam em sua estrutura tridimensional um padrão conformacional comum, com dobramento do tipo α/β hidrolase cujo núcleo central contém oito fitas β que se encontram conectadas por seis α -hélices. Na Figura 8 as α -hélices são representadas pelos cilindros e as fitas β pelas setas planas. Ademais, os pontos preenchidos em preto representam as posições topológicas dos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica, localizada na extremidade C-terminal da fita $\beta 5$ (UPPENBERG *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999).

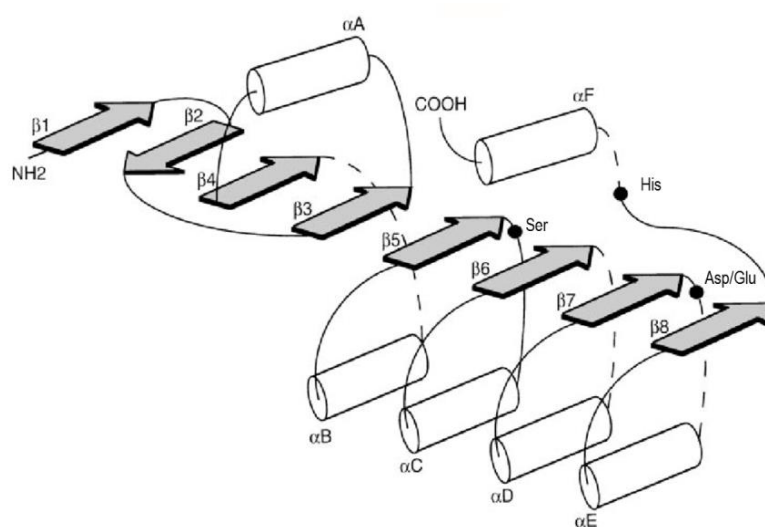


Figura 8. Modelo estrutural de α/β hidrolases.

Fonte: Adaptado de Jaeger *et al.* (1999).

A ativação catalítica, frequentemente necessária em lipases, ocorre através do movimento de uma alça constituída por resíduos de aminoácidos hidrofóbicos (*lid*), que é uma estrutura de α -hélice que recobre o sítio ativo. Em meio aquoso, o sítio catalítico permanece coberto por esta tampa, que o isola do meio de reação. Na interface lipídio/água, a alça se move expondo o sítio catalítico, o que favorece a ligação com o substrato (lipídio) e, assim, a atividade catalítica aumenta drasticamente. Este mecanismo é chamado de ativação interfacial. Entretanto, a presença da alça e a ativação interfacial não são características de todas as lipases e, ainda, a presença da alça em algumas lipases não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial (THOMAS *et al.*, 2005). No caso da lipase de *C. antarctica* B (CalB), ensaios de cristalografia demonstraram que esta assume uma conformação aberta ativa apenas com um canal hidrofóbico exposto ao acesso do solvente (UPPENBERG *et al.*, 1994). A

estrutura tridimensional da CalB está ilustrada na Figura 9, em que a localização do sítio catalítico encontra-se em destaque.

As lipases podem ser encontradas em vegetais (por exemplo, em látex ou sementes), animais (lipases pancreáticas, hepáticas e gástricas) ou micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras), sendo que, na maioria dos casos, as propriedades e a eficiência catalítica destas dependem de sua origem. Bactérias e fungos são as fontes mais utilizadas para a produção de lipases, porque se pode explorar o rápido crescimento destes micro-organismos em meios de cultivo de baixo custo. Ademais, lipases de origem microbiana comumente apresentam alta estabilidade em solventes orgânicos e podem atuar em faixas de temperatura mais amplas. Desta forma, sua aplicação é difundida em diferentes áreas como indústria alimentícia, síntese orgânica, biorremediação de solos e de efluentes e na produção de ésteres graxos para fins combustíveis (REETZ, 2002; PAQUES e MACEDO, 2006).

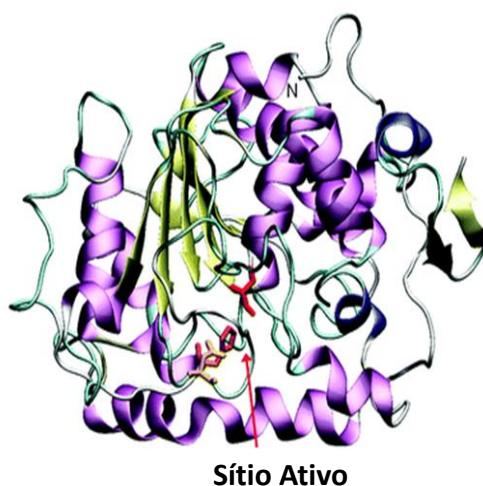


Figura 9. Representação em fitas da estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica* B com ênfase no seu sítio catalítico.

Fonte: Adaptado de IUBMB (2015).

As diferentes propriedades estruturais de lipases, como dimensão e estrutura do sítio ativo, determinam as suas atividades em diversos substratos com alta seletividade, evitando a formação de produtos indesejáveis. A seletividade das lipases permite sua classificação como: quimiosseletivas, quando a enzima apresenta atividade apenas contra um único tipo de grupo funcional na molécula de substrato; regiosseletivas, quando estas fazem distinção entre grupos funcionais localizados em diferentes posições na mesma molécula de substrato; e estereosseletivas, quando se dá o reconhecimento preferencial de um isômero em relação ao outro em misturas racêmicas. Assim, é possível a seleção de uma lipase em particular de acordo

com a modificação desejada de um determinado substrato como, por exemplo, na síntese de ésteres alquílicos de ácidos graxos (UPPENBERG *et al.*, 1994; JAEGER *et al.*, 1999; FABER, 2004; CHRISTOPHER *et al.*, 2014).

Como já relatado anteriormente, as lipases têm atividade catalisando as reações de hidrólise (UPPENBERG *et al.*, 1994). O mecanismo da hidrólise enzimática (Figura 10) inicia-se com a ativação do sítio catalítico, que ocorre principalmente pela formação da ligação de hidrogênio entre os resíduos de histidina e de serina, tornando o grupamento hidroxila da serina mais nucleofílico. Ocorre então o ataque nucleofílico do oxigênio da serina à carbonila da função éster do substrato (triacilglicerol), formando-se um intermediário tetraédrico. Neste estágio há a liberação de uma molécula de álcool e a formação de um complexo acil-enzima. Na sequência, na etapa de desacilação, a água ataca o átomo de carbono do grupamento acila ligado à serina, liberando um ácido graxo. Em seguida, o sítio catalítico é regenerado para poder atuar em um novo ciclo de catálise. Com a mudança da água por outro nucleófilo, como um álcool, ou com a diminuição do teor de água no meio de reação, as lipases podem catalisar reações de transesterificação, obtendo-se ao final do processo três moléculas de ésteres alquílicos de ácidos graxos e uma de glicerol (JAEGER e REETZ, 1998; JAEGER *et al.*, 1999; BORNSCHEUER *et al.*, 2002; KOCHEPKA, 2015).

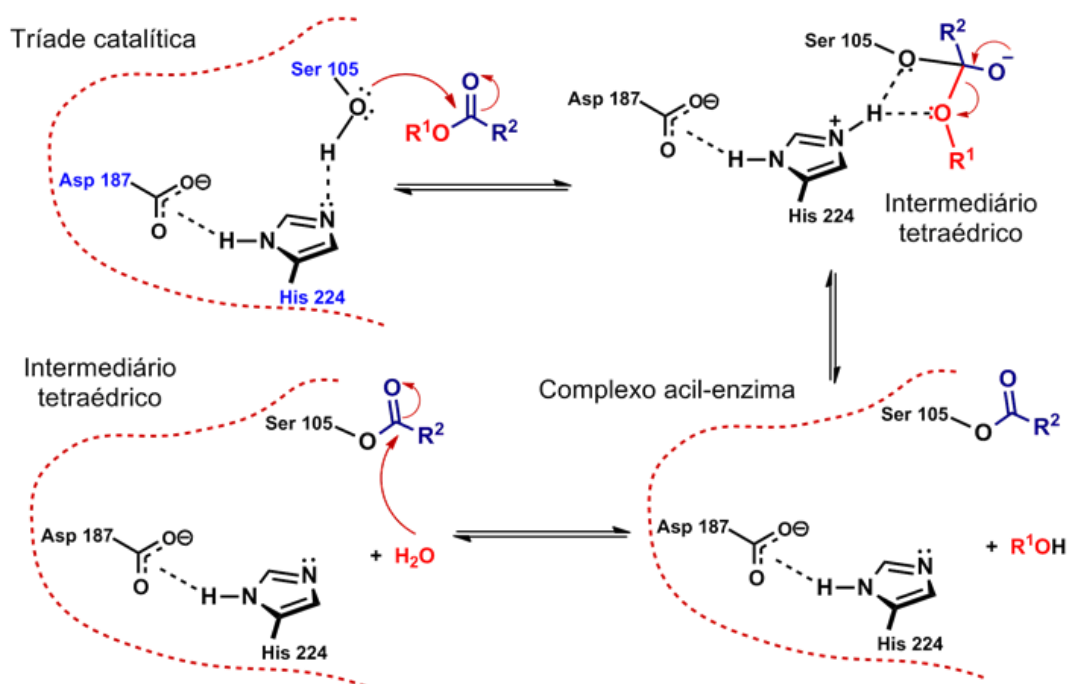


Figura 10. Mecanismo de hidrólise de ésteres catalisado por lipases.

Fonte: Adaptado por Silva (2011), Jaeger *et al.* (1999).

Em processos biocatalíticos, as lipases podem ser utilizadas nas formas livre ou imobilizada. Lipases na forma livre têm como vantagem o seu menor custo, visto que o suporte e o procedimento de imobilização representam um custo adicional à produção. Além disso, a velocidade da reação tende a ser maior porque não há problemas de transferência de massa da forma como geralmente ocorre com as enzimas imobilizadas. Entretanto, lipases livres são mais sensíveis às condições de reação (temperatura e solventes orgânicos) e a separação destas dos produtos finais é dificultada. Processos de imobilização tais como adsorção física, confinamento em matrizes poliméricas, ligações covalentes e encapsulação em membranas ou em micelas reversas, podem melhorar a estabilidade das enzimas e facilitar a sua remoção do meio (PAIVA *et al.*, 2000; AL-ZUHAIR *et al.*, 2007; NIELSEN *et al.*, 2008; PEDERSEN *et al.*, 2014).

A lipase de *C. antarctica* B (CalB) consiste de uma enzima com um grande potencial catalítico em diversas aplicações, cuja massa molecular é de 33 kDa e o ponto isoelétrico (pI) se dá em pH 6. A CalB encontra-se disponível comercialmente nas formas livre e imobilizada, sendo que a imobilizada é conhecida como Novozym 435 (Novozymes, Bagsværd, Dinamarca). A enzima é produzida a partir de cepas recombinantes do micro-organismo *Aspergillus niger* e sua formulação líquida (CalB L) contém em sua composição aproximadamente 46% de água, estabilizantes (glicerol e sorbitol) para prevenir a inativação da enzima e conservantes (benzoatos de sódio e potássio) para evitar crescimento microbiano exógeno. Já a Novozym 435 é a CalB imobilizada em resina acrílica macroporosa polimérica (Lewatit VP OC 1600 - Bayer®). Tal produto apresenta propriedades como tamanho de partícula na faixa de 315-1000 μm , área específica de 130 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ e diâmetro médio de poros de 15 nm (NIELSEN *et al.*, 2008; CABRERA *et al.*, 2009).

Atualmente, existem poucos trabalhos que comparam o uso destas diferentes formulações da CalB. Alguns autores estudaram os efeitos de diferentes álcoois (metanol e 2-propanol) na atividade destas duas lipases durante a produção de ésteres e observaram que a desativação ao longo da reação foi inferior para a enzima imobilizada em relação à enzima livre (MACEIRAS *et al.*, 2011). Todavia, neste trabalho, as reações foram realizadas sob as mesmas condições para ambas as enzimas, usando 10% de catalisador (m m^{-1}) e razões molares (álcool:óleo) de 1:2 e 1:40 a 50 °C e 150 rpm por 8 h; além disto, não foi relatada a quantidade de água presente no meio de reação. Dessa forma, o comportamento das enzimas foi avaliado sem considerar que estas se encontravam em ambientes químicos diferentes, configurando, portanto, um estudo comparativo ainda muito preliminar.

2.4.3.2. Catálise enzimática para a produção de ésteres graxos

O interesse no uso de lipases como catalisadores na síntese de biodiesel deve-se a algumas de suas propriedades, como alta especificidade e seletividade, uma vez que estas agem apenas sob o seu substrato, evitando reações paralelas e podem reduzir os custos de purificação do produto final (ZAKS e KLIBANOV, 1985; JAEGER e REETZ, 1998; VILLENEUVE *et al.*, 2000). Todavia, com a finalidade de melhorar o processo de catálise enzimática há a necessidade de se diminuir os tempos reacionais e aumentar a estabilidade da enzima diante das condições da reação. Assim, diversos parâmetros reacionais precisam ser otimizados (BAJAJ *et al.*, 2010).

A produção de biodiesel via catálise enzimática tem sido orientada ao estudo de enzimas imobilizadas e isto se deve principalmente à possibilidade do seu reuso (POPPE *et al.*, 2015b). Entretanto, o custo inferior de lipases livres tem estimulado o seu emprego e permitiu a implantação de processos industriais como os das empresas norte-americanas Blue Sun Energy e Piedmont Biofuels (KOTRBA, 2012; KOTRBA, 2014). Além disso, Li *et al.* (2013b) recentemente demonstraram a viabilidade da reutilização de uma lipase de *A. niger* na forma livre durante a síntese de ésteres metílicos em um sistema bifásico (óleo:água). Isto foi realizado através do reuso direto da emulsão formada ao final da reação entre glicerol, enzima e água e, desta forma, foram alcançados teores de aproximadamente 90% em ésteres por cinco ciclos reacionais consecutivos.

O processo de síntese de ésteres é influenciado pela forma das lipases utilizadas (livres ou imobilizadas). Dentre os parâmetros relevantes nestas reações está o conteúdo de água, porque lipases necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua conformação ativa. No entanto, uma alta concentração de água no meio de reação pode favorecer reações de hidrólise. Assim, umas das maiores desvantagens do uso de lipases livres é que, como consequência da sua adição ao meio, ocorre um acréscimo significativo na quantidade de água que, ao induzir reações de hidrólise, ocasiona um aumento no teor de ácidos graxos livres no produto final e diminui os rendimentos finais em ésteres. Já no caso de algumas lipases imobilizadas, o controle da água deve ser realizado porque, quando presente em excesso, a água pode preencher os poros no suporte de enzima e reduzir a acessibilidade dos substratos hidrofóbicos ao sítio ativo da enzima (LU *et al.*, 2009; GOG *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2014).

Outra diferença encontrada com a utilização das distintas formas de lipases é o efeito causado pelo coproduto da transesterificação, o glicerol. Isto porque em lipases imobilizadas o glicerol é adsorvido no suporte de imobilização e forma uma camada hidrofílica que impede

que os substratos hidrofóbicos cheguem ao sítio catalítico, onde ocorre a reação. No que diz respeito às lipases livres, como já citado, ao final da reação é formada uma fase hidrofílica no sistema, constituída de glicerol, enzima e água. Neste sistema, o glicerol interage com moléculas de água em torno das proteínas através de um mecanismo denominado de exclusão preferencial, evitando sua desnaturação, e esta fase pode ainda ser reutilizada em um novo ciclo de reação. Todavia, há uma maior complexidade no caso da necessidade de recuperação do glicerol. Neste sentido, tecnologias de separação em membranas vêm sendo desenvolvidas para segregar a lipase livre dos produtos de reação (PAIVA *et al.*, 2000; WATANABE *et al.*, 2000; HAMA e KONDO, 2013; LI *et al.*, 2013b).

A presença de álcool em excesso também é muito importante para o desempenho catalítico das enzimas porque álcoois de cadeia curta como metanol e etanol podem provocar a sua inativação. Esta inativação pode ser ocasionada pela retirada da camada essencial de água que envolve a enzima, cuja presença é essencial para manter a sua conformação ativa, ou ainda por inibição competitiva, onde moléculas do álcool se ligam ao sítio ativo reduzindo o acesso ao substrato hidrofóbico. A inativação pode ser um problema ainda maior para o caso das lipases livres, pois o contato destas com os substratos da reação é muito mais efetivo. Em lipases imobilizadas, este inconveniente existe em uma dimensão menor porque a lipase está menos exposta e a imobilização restringe a sua liberdade conformacional, bem como os seus efeitos de desnaturação. No entanto, na medida em que o glicerol permaneça aderido ao suporte da lipase, o álcool empregado como reagente em excesso tende a migrar para esta região, o que pode induzir à inativação da lipase. Portanto, a quantidade de álcool utilizada é uma variável a ser cuidadosamente otimizada (SHIMADA *et al.*, 2002; NOUREDDINI *et al.*, 2005; NIELSEN *et al.*, 2008; ANTCZAK *et al.*, 2009; HAMA *et al.*, 2011).

O emprego de solventes exógenos (que não atuam como substratos da enzima) geralmente hidrofóbicos na síntese enzimática de ésteres graxos é uma estratégia utilizada para minimizar a inativação devida ao excesso de álcool. Além disso, a solubilidade dos substratos hidrofóbicos em álcoois de cadeia curta pode ser aumentada e a viscosidade da mistura reacional diminuída, melhorando a difusão dos substratos para o sítio ativo. Melhorias na produção de ésteres em sistemas que empregam solventes já foram demonstradas tanto para o uso de lipases livres quanto para lipases imobilizadas. Hexano, heptano, propanol e *t*-butanol são os mais frequentemente utilizados, no entanto, tornam o processo mais caro em virtude da necessidade de recuperação do solvente e do tratamento dos resíduos orgânicos. Além disso, a maioria dos solventes orgânicos são voláteis, tóxicos e inflamáveis. Desta forma, a utilização de sistemas livres de solventes, onde o meio reacional é composto apenas pelos substratos da

reação, vem sendo investigada por muitos autores. Os maiores ganhos do uso destes sistemas são a recuperação do produto sem as etapas de evaporação do solvente e a utilização dos substratos em altas concentrações, elevando a sua produtividade e minimizando custos processuais. Ademais, o processo torna-se mais seguro e ambientalmente correto (PÁEZ *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2008; QIN *et al.*, 2008; YAN *et al.*, 2014).

O potencial de lipases imobilizadas para a produção de biodiesel já foi foco de muitos estudos. Poppe *et al.* (2015b) investigaram a produção de ésteres etílicos em um sistema livre de solventes, empregando os óleo de oliva e de palma como substratos e a mistura de três lipases imobilizadas como catalisadores: Novozym 435 (CalB), Lipozyme TL-IM (TLL) e Lipozyme RM-IM (RML). Para o óleo de oliva, a combinação de 29,0% de TLL, 12,5% de RML e 58,5% de CALB foi a melhor condição encontrada, gerando uma conversão de 95% em ésteres em 18 h de reação. Já para o óleo de palma, a melhor combinação foi de 52,5% de TLL e 47,5% de RML, que resultou em 80% de ésteres em 18 h. Outros autores investigaram a síntese de ésteres etílicos na ausência de solventes utilizando lipases livres como sistema catalítico. Por exemplo, Pedersen *et al.* (2014), ao estudarem a etanólise de óleo de colza utilizando a lipase de Callera Trans L na forma livre, demonstraram que a melhor condição envolvia razão molar etanol:óleo de 4,5:1 e 20% de água em relação à massa de óleo, o que permitiu a obtenção de uma conversão de 98% em 24 h. Embora tenham sido encontradas elevadas conversões em ésteres, nota-se que a maior desvantagem do processo enzimático é o longo tempo de reação quando comparado aos catalisadores homogêneos alcalinos convencionais. Por exemplo, Santori *et al.* (2012) demonstraram que a metanólise do óleo de soja, utilizando KOH como catalisador, resultou em 95% de ésteres em 1 h de reação a 40 °C.

Para viabilizar a produção de biodiesel via catálise enzimática, há a necessidade de aumentar as suas taxas de reação. Isto pode ser realizado através do emprego de tecnologias de intensificação do processo, que incluem ondas ultrassônicas, irradiação de micro-ondas e diferentes desenhos de reatores (LOURINHO e BRITO, 2015). Dentre estas, a irradiação de micro-ondas é um método de aquecimento conhecido devido à alta eficiência, capaz de reduzir o tempo necessário para alcançar elevadas conversões (SANSEVERINO, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2010).

2.5. Micro-ondas

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas não ionizantes que possuem frequência de 300 a 300.000 MHz, correspondendo a comprimentos de onda de 1 mm a 1 m. Para evitar

interferências, os equipamentos domésticos e industriais geralmente operam em um comprimento de onda de 12,2 cm, que corresponde a 2,45 GHz. O uso da irradiação de micro-ondas como uma fonte de energia para aquecimento apresenta benefícios em relação ao uso de fontes convencionais (como chapas de aquecimento, mantas e incubadoras). Dentre as vantagens estão a obtenção de taxas de aquecimento superiores, a absorção de energia apenas pelos reagentes ou solventes e a transferência de energia diretamente para a amostra, sem que ocorra contato físico com a fonte de aquecimento. Desta forma, não ocorrem gradientes de temperatura e superaquecimentos localizados, promovendo rendimentos superiores, maior seletividade e menor decomposição térmica da amostra (LIDSTRÖM *et al.*, 2001; SANSEVERINO, 2002). Esse tipo de energia é gerado por uma válvula chamada magnetron, que consiste de um dispositivo a vácuo que converte energia elétrica em energia eletromagnética. Os princípios envolvidos no aquecimento por micro-ondas concentram-se em conceitos químicos e físicos, tais como temperatura, ligação química, estrutura molecular, momento de dipolo, polarização, capacidade calorífica e constante dielétrica.

Existem dois mecanismos responsáveis pelo aquecimento por micro-ondas, que também é chamado de aquecimento dielétrico (FORTUNY *et al.*, 2008). O primeiro mecanismo, denominado rotação de dipolo, relaciona-se com o alinhamento das moléculas (que têm dipolos permanentes ou induzidos) com o campo elétrico aplicado. Quando estão sob influência das micro-ondas as oscilações dos dipolos elétricos das moléculas não acompanham as mudanças do campo elétrico e parte da energia eletromagnética é armazenada e posteriormente dissipada por colisões moleculares, dando-se origem ao aquecimento. Já o segundo fenômeno é chamado de condução iônica e o calor é gerado por perdas pelo atrito entre moléculas, o que ocorre pela migração dos íons dissolvidos quando sob a ação de um campo eletromagnético (LIDSTRÖM *et al.*, 2001; SANSEVERINO, 2002; FORTUNY *et al.*, 2008).

Reações orgânicas com aquecimento dielétrico podem ser conduzidas em fornos de micro-ondas modificados ou em reatores específicos para este fim. O surgimento de reatores para condução destas reações é uma consequência do estudo das reações em forno doméstico, que demonstrou o grande potencial desta técnica. Atualmente, equipamentos especializados têm substituído o uso de fornos domésticos por questões de segurança. Além disso, estes equipamentos oferecem vantagens adicionais como a possibilidade de realização de refluxo, controle de temperatura e pressão e a distribuição homogênea das micro-ondas (SANSEVERINO, 2002; MOTASEMI e ANI, 2012).

Um dos maiores inconvenientes desta técnica é a dificuldade de expandir a síntese realizada em micro-ondas da escala laboratorial para a escala industrial, principalmente quando

amostras complexas estão envolvidas. Isto ocorre porque a profundidade de penetração da radiação de micro-ondas é dependente do material a ser aquecido e, às vezes, esta é de apenas alguns poucos centímetros. Adicionalmente, o aspecto da segurança no trabalho é outra razão que limita o emprego do aquecimento dielétrico na indústria. Assim, um maior entendimento a respeito dos aspectos relacionados ao uso de micro-ondas é necessário para o desenvolvimento de processos industriais bem sucedidos, uma vez que seu emprego pode ser viável devido as vantagens que apresenta em relação a outros métodos de aquecimento (BARNARD *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2012; GUDE *et al.*, 2013). Barnard *et al.* (2007) demonstraram através de cálculos de consumo energético que, para a produção de ésteres metílicos com conversão de até 99% mediante o uso de KOH como catalisador, os gastos energéticos do uso de micro-ondas são cerca de 5% menores do que o processo em batelada e quando a operação é realizada em fluxo contínuo, estes gastos correspondem a apenas 25% daqueles relacionados ao aquecimento convencional.

Diversos trabalhos sobre a produção de ésteres alquílicos com o uso de micro-ondas já foram relatados na literatura (MOTASEMI e ANI, 2012). Chen *et al.* (2012) demonstraram que, com a irradiação de micro-ondas, o tempo de reação necessário para atingir teores em ésteres de 97,9% na presença de 0,75% de CH_3ONa como catalisador foi de apenas 3 min, utilizando razão molar de metanol:óleo de 6:1 e 750 Watts de potência. No entanto, poucos estudos foram até hoje dedicados ao efeito das micro-ondas sobre a síntese de biodiesel via catálise enzimática (REJASSE *et al.*, 2004; REJASSE *et al.*, 2006; NOGUEIRA *et al.*, 2010; DA RÓS *et al.*, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2014; QUEIROZ *et al.*, 2015).

2.5.1. O uso de micro-ondas em catálise enzimática

O emprego de micro-ondas em síntese enzimática ainda é limitado e a literatura sobre o assunto é muitas vezes controversa. Alguns autores sugerem que uma transferência de energia direta entre o campo eletromagnético e os domínios polares da proteína poderia induzir a modificação de sua flexibilidade e, conseqüentemente, alterar as suas propriedades. Alguns estudos citam que este efeito não é relacionado com o aquecimento promovido pela irradiação, mas sim com um efeito não térmico e que este ocorre quando, sem alteração da temperatura, a irradiação interage com a estrutura das enzimas, fazendo com que estas demonstrem maior atividade e estabilidade nas condições reacionais (REJASSE *et al.*, 2004; REJASSE *et al.*, 2007; YOUNG *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2011).

Rejasse *et al.* (2006) avaliaram a estabilidade e a reatividade de CalB livre em temperaturas variando de 40 °C a 100 °C para a reação de alcoólise entre butirato de etila e butanol em um sistema livre de solventes. Nestas condições, a radiação de micro-ondas não teve efeito sobre a atividade de alcoólise, porém, afetou a estabilidade enzimática da lipase, pois a inativação da lipase livre a 100 °C foi mais branda quando o meio de reação foi aquecido por micro-ondas. Estes autores afirmaram que a interação do campo de micro-ondas com a enzima pode induzir uma modificação de sua estrutura, alterando a sua estabilidade.

Além dos efeitos da absorção de micro-ondas pelas lipases em reações de síntese de ésteres, outros componentes do meio reacional podem absorver a energia, o que ocasiona um aumento dos efeitos de emulsificação do meio e da velocidade da reação (YU *et al.*, 2010). Neste sentido, Nogueira *et al.* (2010) estudaram a etanólise do óleo de macaúba (*Acrocomia aculeata*) assistida por micro-ondas na presença de dois catalisadores enzimáticos, as lipases Novozym 435 (*A. niger*) e Lipozyme IM (*Mucor miehei*), em um sistema livre de solventes. Rendimentos próximos a 45% em ésteres foram obtidos para a lipase Novozym 435 em 15 min, e de 35% para Lipozyme IM em 5 min. A lipase Lipozyme IM teve boa atividade apenas até 5 min de reação e tempos de reação mais elevados tiveram um efeito negativo sobre a conversão. Já a Novozym 435 catalisou a reação mais lentamente ($\leq 25\%$ de ésteres em 5 min), mas apresentou maior tolerância às micro-ondas, atingindo uma conversão superior em tempos de reação de 15 min.

Da Rós *et al.* (2012) investigaram a etanólise de sebo bovino catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-poliacetato de vinila (PVA) empregando um sistema livre de solventes. As reações foram realizadas em reator de micro-ondas com variação da potência de 8 a 15 Watts. As condições ótimas foram encontradas sob razão molar etanol:sebo bovino de 6:1 a 50 °C, nas quais conversões próximas de 100% em ésteres foram obtidas em 8 h, alcançando uma produtividade de 92 mg de ésteres g⁻¹ h⁻¹. Isto representou um acréscimo de seis vezes em relação ao processo conduzido sob aquecimento convencional.

Da Rós *et al.* (2014) avaliaram o efeito do aquecimento de micro-ondas sobre a reação de etanólise do óleo de babaçu (*Orrbignya sp.*) empregando a lipase de *B. cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA. A temperatura de reação e a razão molar etanol:óleo foram otimizadas e aproximadamente 100% de conversão foi atingida sob razão molar etanol:óleo 12:1 a 50 °C. Estes resultados foram obtidos em 10 h, enquanto que com o aquecimento convencional respostas similares foram obtidas somente em 48 h de reação.

Yu *et al.* (2011) apontaram um efeito de sinergia entre a irradiação de micro-ondas e um tipo de líquido iônico ([EMIM][PF₆]) sobre a atividade enzimática da lipase Novozym 435. Nas

condições de potência de 480 W, razão volumétrica [EMIM][PF₆]:óleo de 2:1, razão molar metanol:óleo de 6:1, 6% de Novozym 435 (em relação à massa de óleo), atividade de água de 0,33 e velocidade de agitação de 200 rpm a 60 °C, um teor de 92% em ésteres metílicos foi obtido em 6 h. Teores de 70 e 28% foram obtidos nestas condições sem a irradiação de micro-ondas e sob micro-ondas sem o uso do líquido iônico, respectivamente. Ademais, foram realizados reusos do líquido iônico e da enzima, que demonstraram a manutenção da atividade enzimática por cinco ciclos consecutivos de reação.

Queiroz *et al.* (2015) também demonstraram um acréscimo da conversão do óleo de soja em ésteres etílicos quando a transesterificação foi realizada em reator de micro-ondas empregando a lipase Novozym 435. Este aumento foi de 57% com o uso de aquecimento convencional para aproximadamente 99% com a irradiação de micro-ondas em 3 h de reação. Outras condições de reação envolveram o uso de 10% de *tert*-butanol, razão molar etanol:óleo de 3:1 e 50 Watts de potência.

Apesar da descrição feita por diferentes autores sobre o aumento das taxas de reações enzimáticas por irradiação de micro-ondas, poucos estudos têm se dedicado ao uso de lipases livres nestes sistemas. Além disso, estudos de avaliação da estabilidade da enzima e seu reuso em reatores de micro-ondas empregando sistemas livres de solventes ainda são bastante escassos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Produzir ésteres etílicos de materiais graxos via catálise enzimática empregando lipases comerciais de *C. antarctica* B, livre e imobilizada em resina poliacrílica, sob aquecimento convencional e por irradiação de micro-ondas em sistema livre de solventes.

3.2. Objetivos Específicos

- I. Determinar as propriedades das lipases livre e imobilizada através da caracterização de suas atividades catalíticas e da quantificação de proteínas totais;
- II. Avaliar a influência dos parâmetros de reação na síntese de ésteres etílicos catalisada por lipases comerciais de *C. antarctica* B, livre e imobilizada, sob aquecimento convencional;
- III. Analisar a influência das variáveis envolvidas no processo de produção de ésteres etílicos sob irradiação de micro-ondas e otimizá-las através de um planejamento fatorial;
- IV. Investigar o reuso das enzimas a partir das melhores condições de reação encontradas nos diferentes sistemas de aquecimento;
- V. Realizar um estudo comparativo do desempenho das lipases livre e imobilizada nas reações de síntese de ésteres etílicos, empregando sistemas de aquecimento convencional e por micro-ondas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

As enzimas utilizadas foram as lipases comerciais de *C. antarctica* B, livre e imobilizada em resina poliacrílica, fornecidas pela empresa Novozymes® Latin America Ltda. (Araucária, PR). O material graxo empregado foi o óleo de soja refinado (Leve®, Araucária, PR), obtido no comércio local. Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) já nas especificações requeridas pelas metodologias utilizadas.

O reator de micro-ondas empregado neste trabalho foi o da Discover Legacy, modelo 908005 (CEM® Corporation, São Paulo, SP), que possui uma câmara interna cilíndrica com revestimento em teflon onde são inseridos os frascos de reação. O equipamento é dotado de agitação magnética, a qual pode ser ajustada em três níveis: baixo, médio e alto. A potência de saída é variável na faixa de 0-300 W e a temperatura é medida por um sensor de infravermelho localizado no fundo da câmara onde fica o vaso de reação. Ademais, o programa de controle do instrumento é projetado para que seja fornecida a menor saída de potência possível para manter a temperatura programada.

4.2. Metodologia Experimental

4.2.1. Caracterização da matéria-prima

O óleo vegetal foi caracterizado quanto ao índice de saponificação (AOCS Cd 3-25), teor de ácidos graxos livres e índice de acidez (AOCS Ca 5a-40) através de metodologias estabelecidas pela American Oil Chemists' Society (AOCS). O índice de saponificação foi então utilizado para o cálculo da massa molar dos materiais passíveis de saponificação presentes no óleo de soja, de acordo com a metodologia AOCS Cd 3-25, e o valor encontrado foi empregado para os demais cálculos de relações estequiométricas e ajustes das variáveis envolvidas neste estudo (AOCS, 1989; AOCS, 1990).

A determinação do teor de água foi feita por titulação redox em equipamento Karl Fischer da marca KEM® (Kyoto, Japão), modelo EBU-610-KF, empregando o procedimento coulométrico (0,01 a 100 mg de H₂O) com corrente alternada polarizada e eletrodo duplo de platina.

4.2.2. Determinação do perfil cromatográfico da matéria-prima

A composição em ácidos graxos da matéria-prima foi obtida pela análise cromatográfica dos seus respectivos ésteres metílicos. Os ésteres foram preparados a partir da metodologia descrita por Hartman e Lago (1973) e adaptada para uso em microescala (MENEZES *et al.*, 2013). Inicialmente, pesou-se aproximadamente 200 mg do óleo de soja refinado em um tubo de ensaio e na sequência adicionou-se 3 mL de uma solução de 0,5 mol de NaOH em 1 L de metanol. Os tubos de ensaio foram selados e esta mistura foi aquecida em banho-maria a 90 °C por 10 min. Após o resfriamento, adicionou-se 9 mL de uma solução esterificante, preparada a partir de 60 mL de metanol e 2 g de cloreto de amônio, e a mistura foi agitada durante 5 min. Na sequência, houve a adição de 3 mL de ácido sulfúrico seguida de agitação até a total dissolução do sal. As amostras contendo a solução esterificante foram então mantidas em banho-maria a 90 °C por 10 min. A mistura foi resfriada e a esta adicionou-se 5 mL de heptano para separação de fases e recuperação da fração lipídica. Após esta etapa, acrescentou-se 5 mL de água deionizada para que ocorresse a total separação dos produtos. A fração orgânica foi então separada, evaporada e seca em dessecador durante 48 h. O perfil dos ésteres obtidos foi analisado por cromatografia nas condições descritas no item 4.2.10.

4.2.3 Determinação de proteínas totais nas lipases livre e imobilizada

4.2.3.1. Procedimentos utilizados para a lipase livre

A dosagem das proteínas presentes na CalB L foi realizada com o emprego da enzima sem tratamento prévio através da metodologia descrita no item 4.2.3.3. Além disso, para evitar a interferência de compostos presentes na formulação da enzima, também foi empregado o mesmo procedimento para a quantificação das proteínas totais após a sua diálise contra água deionizada (BRIGGS *et al.*, 1981; HÄMÄLÄINEN e LÖNNBERG, 1991). Para isto, uma amostra de 1 mL do preparado enzimático foi inserida em uma membrana de celulose para diálise de 10 mm de largura e 15 cm de comprimento (Sigma-Aldrich), com limite de exclusão em 14 kDa. Em seguida, esta membrana foi submersa em um béquer de 2 L contendo água deionizada, que foi mantido sob agitação constante por 24 h na temperatura ambiente, sendo que a água do béquer foi substituída após 3 e 12 h de diálise. Posteriormente, o saco de diálise foi aberto e a enzima dializada foi levada à quantificação de proteínas totais pelo método descrito em 4.2.3.3.

4.2.3.2. Procedimentos utilizados para a lipase imobilizada

A quantificação de proteínas na lipase imobilizada foi precedida de duas metodologias de extração. O primeiro ensaio foi realizado de acordo com o método descrito por Chen *et al.* (2008), em que 60 mg de Novozym 435 foram colocados em um tubo Eppendorf contendo 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), que foi incubado a 37 °C por 30 min. Posteriormente, a fração sólida foi removida e a quantificação das proteínas contidas na fração de DMSO foi realizada conforme descrito no item 4.2.3.3.

Outra estratégia foi a adição de 60 mg de Novozym 435 em um tubo Eppendorf contendo 1 mL de uma solução 10% v v⁻¹ de sulfato de dodecila (SDS), que permaneceu a 90 °C em banho maria por 30 min (IZQUIERDO *et al.*, 2014). Em seguida, o material sólido obtido de cada ensaio de extração foi retirado por filtração e a quantidade de proteínas removida pelo detergente foi determinada através do método descrito no item 4.2.3.3.

4.2.3.3. Dosagem de proteínas totais pelo método do ácido bicinconínico

A quantificação de proteínas nas duas lipases (CalB L e Novozym 435) foi realizada através do método do ácido bicinconínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985) utilizando um kit comercial (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA).

A metodologia consiste em preparar uma mistura do reagente A [carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinconínico e tartarato de sódio em 0,1 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio] e do reagente B [solução contendo 4% (m v⁻¹) de sulfato de cobre], na proporção de 50:1. Para cada teste foram adicionados 2 mL desta mistura em um tubo de ensaio, seguido de 100 µL de amostra. Os tubos foram incubados a 37 °C por 30 min e cada amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo para leitura, que foi realizada em espectrofotômetro UV/Vis (Varian®, modelo CARY 100 Scan) no comprimento de onda de 562 nm. Um padrão de albumina sérica bovina (BSA) foi utilizado para o preparo da curva de calibração para a quantificação das proteínas, que foi obtida nas mesmas condições do ensaio.

4.2.4. Atividade de esterificação em meio orgânico

A atividade de esterificação das lipases, livre e imobilizada, foi determinada pelo procedimento padrão de síntese do oleato de etila. As reações foram conduzidas em agitador orbital com Erlenmeyers de 25 mL contendo 5 mL de heptano, 20 mg de enzima imobilizada

ou 100 μL de enzima livre, 70 mmol L^{-1} de ácido oleico e 210 mmol L^{-1} de etanol a 40 °C e agitação de 200 rpm (228,6 G) (ALNOCH, 2013). Foram retiradas alíquotas de 100 μL do meio de reação em intervalos fixos para posterior quantificação indireta do teor de ésteres formados, a partir da quantificação dos ácidos graxos residuais pelo método de Lowry e Tinsley (1976).

Tal metodologia consiste em adicionar 100 μL da amostra em Eppendorfs de 2 mL, contendo 1,15 mL de hexano e 250 μL de reativo de cor, que consiste em uma solução aquosa de acetato de cobre II 5% (m v^{-1}) em pH 6,0-6,2, corrigido previamente com piridina. A mistura foi agitada em vórtex durante 40 s e a amostra foi transferida a uma cubeta de quartzo para leitura da absorvância da fase orgânica, que foi realizada no comprimento de onda de 715 nm em espectrofotômetro UV/Vis (Varian®, modelo CARY 100 Scan). A concentração de ácidos graxos no meio foi determinada através de uma curva de calibração, que foi construída com ácido oleico (Sigma, 90%) nas mesmas condições do ensaio, levando em consideração o fator de correção devido à pureza do padrão de referência.

A atividade enzimática foi calculada pela taxa de consumo de ácidos graxos do meio reacional durante o período que caracteriza a velocidade inicial da reação, situação em que há saturação da enzima pelo substrato. Uma unidade de atividade enzimática (U) corresponde a síntese de 1 μmol de éster por unidade de tempo.

4.2.5. Atividade de hidrólise em meio aquoso

A liberação de ácidos graxos a partir da ação hidrolítica das lipases foi determinada por titulometria utilizando uma solução de NaOH (0,05 mol L^{-1}) em um titulador automático do tipo pHStat (Metrohn 718 Stat Titrino).

Esta metodologia consiste em preparar uma emulsão com goma arábica em uma concentração de 3% (m v^{-1}), contendo 2 mmol L^{-1} de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mmol L^{-1} de tampão Tris-HCl (pH 8) e 150 mmol L^{-1} de NaCl. A esta emulsão foram adicionados 62 mmol L^{-1} do substrato trioleína e a mistura foi homogeneizada por 15 min em liquidificador. Foram utilizados 100 mg de enzima imobilizada ou 0,1 mL do preparado enzimático livre, que foram adicionados em 20 mL da emulsão no frasco de reação e sob agitação magnética a 300 rpm (342,8 G), a 40 °C e pH 7 (TISS, 2001; MARTINI, 2012).

A reação foi monitorada durante 5 min, sendo que uma unidade de atividade lipolítica (U) foi definida como a produção de 1 μmol de ácidos graxos por min, nas condições do ensaio.

4.2.6. Atividade de hidrólise em meio orgânico

O ensaio que tem como finalidade de determinar a atividade hidrolítica da enzima em meio orgânico foi realizado em frascos Erlenmeyer de 25 mL sob agitação orbital, contendo 5 mL de meio reacional e aproximadamente 20 mg da enzima imobilizada ou 60 μ L da enzima livre. O meio reacional foi constituído de 4,9 mL de heptano, 70 mmol L⁻¹ de trioleína e 0,1 mL (2% v v⁻¹) de água destilada. Os ensaios foram realizados sob agitação de 200 rpm (228,6 G) a 40 °C e alíquotas de 100 μ L foram coletadas do meio reacional em intervalos previamente fixados (ALNOCH, 2013). Posteriormente, o método de Lowry-Tinsley (vide item 4.2.4) foi empregado para determinação do teor de ácidos graxos no meio. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a produção de 1 μ mol min⁻¹ de ácidos graxos, nas condições do ensaio.

4.2.7. Síntese enzimática de ésteres de etila pela lipase livre sob aquecimento convencional

As reações de etanolise foram realizadas sob agitação orbital em frascos Erlenmeyer de 125 mL a 40 °C e 150 rpm (171,4 G). Em todos os ensaios foram utilizados 15 mmol de substrato (óleo de soja) e 5% de enzima em relação à massa de óleo, o que corresponde a 0,67 g ou 114 ± 2 U (atividade de hidrólise em pHstat) por g de óleo, sendo que os demais reagentes foram ajustados em relação a esta quantidade de substrato. A reação foi acompanhada pela análise de alíquotas retiradas dos frascos.

O emprego da enzima livre na reação de etanolise foi estudado através da avaliação dos efeitos de forma univariada dos seguintes parâmetros: adição de água (porcentagem em relação à massa de óleo), presença de solvente (10% de hexano em relação à massa de óleo) e razão molar de etanol:óleo. Ao final de cada reação, o meio reacional foi centrifugado e, na sequência, a fase orgânica foi levada para remoção do etanol por evaporação sob pressão reduzida a 70 °C. Posteriormente, a amostra foi analisada por cromatografia de permeação em gel (CPG) de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.11.

A acidez das amostras foi analisada por titulação, que foi feita em duplicata para verificar a ocorrência de hidrólise. Este procedimento foi realizado de acordo com o método de teor de ácidos graxos livres Ca 5a-40 (AOCS).

4.2.8. Estudos multivariados da síntese de ésteres etílicos pelas lipases livre e imobilizada sob aquecimento convencional

Alguns parâmetros da reação de etanólise com o emprego da enzima livre foram avaliados através de um planejamento fatorial de três fatores em dois níveis (2^3) com duplicata no ponto central. Os fatores avaliados neste planejamento foram: razão molar etanol:óleo, concentração de enzima em relação à massa de óleo e porcentagem de água no meio. O tempo de reação foi fixado em 8 h. Na Tabela 1 estão apresentadas as condições empregadas no planejamento, incluindo os níveis codificados e os valores reais das variáveis estudadas nos pontos inferior (-1), superior (+1) e central (0). As três variáveis independentes foram combinadas pelo programa Statistica 8.0 e os experimentos foram realizados de maneira aleatória.

Tabela 1. Delineamento experimental 2^3 para etanólise de óleo de soja catalisada pela lipase livre sob aquecimento convencional.

Ensaio	ENZ (%) ^a		RM ^b		Água (%) ^c	
	Código	VR ^d	Código	VR ^d	Código	VR ^d
1	-1	3	-1	3:1	-1	10,3
2	+1	7	-1	3:1	-1	10,3
3	-1	3	+1	9:1	-1	10,3
4	+1	7	+1	9:1	-1	10,3
5	-1	3	-1	3:1	+1	20,3
6	+1	7	-1	3:1	+1	20,3
7	-1	3	+1	9:1	+1	20,3
8	+1	7	+1	9:1	+1	20,3
9 ^{pc}	0	5	0	6:1	0	15,3
10 ^{pc}	0	5	0	6:1	0	15,3

^a Porcentagem de enzima em relação a massa de óleo; ^b Razão molar etanol:óleo; ^c Porcentagem de água em relação a massa de óleo; ^d Valor real; ^{pc} Ponto central.

A produção de ésteres etílicos com o emprego da enzima imobilizada foi investigada através de um planejamento fatorial de três fatores em dois níveis (2^3) com triplicata no ponto central. Neste estudo, foram avaliados os mesmos fatores considerados para o emprego da enzima livre e o tempo de reação também foi fixado em 8 h. Entretanto, os níveis avaliados diferem daqueles apresentados para o planejamento fatorial da etanólise catalisada pela enzima

livre. Isto foi estabelecido baseando-se em estudos preliminares que indicaram que a enzima imobilizada não catalisa adequadamente reações de (trans)esterificação na presença de níveis muito elevados de água (TALUKDER *et al.*, 2009; KOCHPEKA, 2015). Além disso, foi também constatada a necessidade de emprego de maiores razões molares de óleo:etanol. Na Tabela 2 está representado o delineamento experimental utilizado, que apresenta os níveis codificados e os valores reais das variáveis estudadas, compreendendo o ponto inferior (-1), superior (+1) e central (0). Os experimentos foram realizados de maneira aleatória com as três variáveis independentes combinadas pelo Software Statistica 8.0.

Tabela 2. Delineamento experimental 2³ para etanólise de óleo de soja catalisada pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional.

Ensaio	ENZ (%) ^a		RM ^b		Água (%) ^c	
	Código	VR ^d	Código	VR ^d	Código	VR ^d
1	-1	3,0	-1	6:1	-1	0,3*
2	+1	6,0	-1	6:1	-1	0,3*
3	-1	3,0	+1	12:1	-1	0,3*
4	+1	6,0	+1	12:1	-1	0,3*
5	-1	3,0	-1	6:1	+1	1,3
6	+1	6,0	-1	6:1	+1	1,3
7	-1	3,0	+1	12:1	+1	1,3
8	+1	6,0	+1	12:1	+1	1,3
9 ^{pc}	0	4,5	0	9:1	0	0,8
10 ^{pc}	0	4,5	0	9:1	0	0,8
11 ^{pc}	0	4,5	0	9:1	0	0,8

^a Porcentagem de enzima em relação à massa de óleo; ^b Razão molar etanol:óleo; ^c Porcentagem de água em relação a massa de óleo; ^d Valor real; ^{pc} Ponto central; *Valores referentes ao encontrado no meio de reação, sem adição de água.

O valor de 0,3% de água refere-se ao teor de água encontrado no meio de reação, relativo às contribuições dos teores medidos no óleo e no etanol, anteriormente à adição de água ao sistema. Este valor também foi considerado como parte do total de água adicionado ao meio de reação.

Todos os experimentos foram realizados em agitador orbital com frascos Erlenmeyer de 125 mL a 40 °C e 150 rpm (171,4 G), utilizando 15 mmol de óleo de soja e com os demais reagentes ajustados em relação a esta quantidade de substrato.

No caso da enzima livre, o meio reacional foi centrifugado ao final de cada reação, o etanol foi evaporado da fase orgânica sob pressão reduzida a 70 °C e a amostra foi posteriormente analisada quanto a sua composição. Já para a enzima imobilizada, finalizada a reação, o meio foi filtrado para a remoção do catalisador, o etanol foi removido por evaporação sob pressão reduzida a 70 °C e a camada rica em ésteres etílicos também foi analisada.

Uma vez identificada a melhor condição do planejamento experimental baseado no uso da enzima livre, a influência do tempo de reação foi avaliada sobre a formação de EEAG e AGL. Para isto, experimentos isolados foram realizados nos tempos de reação de 15 min e de 1, 2, 4, 6 and 8 h.

As amostras obtidas para os experimentos realizados com ambas as enzimas foram caracterizadas por cromatografia de permeação em gel de acordo com a metodologia descrita no item 4.2.11. Ademais, a acidez das amostras foi analisada por titulação, que foi realizada sempre em duplicata conforme descrito no item 4.2.7.

4.2.9. Síntese de ésteres etílicos pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas

A obtenção de ésteres etílicos assistida por irradiação de micro-ondas foi investigada através de um delineamento composto central contendo três fatores em dois níveis (2^3) com duplicata no ponto central. Os fatores considerados neste ensaio foram: a razão molar etanol:óleo, concentração de enzima e o teor de água nos níveis descritos na Tabela 3, sempre em relação à massa de óleo empregada na reação. Para isto, foram utilizados 40 mmol de óleo de soja (35,31 g) e as demais variáveis foram ajustadas em relação a esta quantidade de substrato. As reações foram realizadas a 40 °C em um balão de fundo plano de 100 mL que foi adaptado ao reator de micro-ondas. A potência modulada para o controle desta temperatura variou de 2-6 W e a agitação magnética do sistema foi mantida na máxima potência do equipamento. Finalmente, o tempo destas reações foi fixado em 1 h para que se pudessem avaliar os efeitos dos parâmetros reacionais investigados, já que o uso de micro-ondas permite a obtenção de elevados teores em ésteres em tempos de reação relativamente curtos (DA RÓS *et al.*, 2012).

A influência do tempo de reação foi avaliada sobre a produção de EEAG e AGL através de experimentos realizados na melhor condição do planejamento experimental. Para isto, experimentos isolados foram realizados nos tempos de reação de 3, 5, 10, 15 e 30 min e de 1, 2, 3 e 4 h. Definido o melhor tempo de reação, foram realizados ensaios em diferentes temperaturas (50 °C e 70 °C), mantendo os demais parâmetros fixos nas mesmas condições

experimentais utilizadas anteriormente. Ao término de cada reação, uma alíquota foi retirada do meio de reação e esta foi analisada quanto ao teor de ésteres por cromatografia (item 4.2.11) e quanto ao teor de ácidos graxos livres por titulação (vide item 4.2.7).

Tabela 3. Delineamento experimental 2³ para etanólise de óleo de soja catalisada pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas.

Ensaio	RM ^a		Água (%) ^b		ENZ (%) ^c	
	Código	VR ^d	Código	VR ^d	Código	VR ^d
1	-1	3:1	-1	10,3	-1	3
2	+1	9:1	-1	10,3	-1	3
3	-1	3:1	+1	20,3	-1	3
4	+1	9:1	+1	20,3	-1	3
5	-1	3:1	-1	10,3	+1	7
6	+1	9:1	-1	10,3	+1	7
7	-1	3:1	+1	20,3	+1	7
8	+1	9:1	+1	20,3	+1	7
9 ^{pc}	0	6:1	0	15,3	0	5
10 ^{pc}	0	6:1	0	15,3	0	5
11	-1	3:1	0	15,3	0	5
12	+1	9:1	0	15,3	0	5
13	0	6:1	-1	10,3	0	5
14	0	6:1	+1	20,3	0	5
15	0	6:1	0	15,3	-1	3
16	0	6:1	0	15,3	+1	7

^a Razão molar etanol:óleo; ^b Porcentagem de água em relação à massa de óleo; ^c Porcentagem de enzima em relação à massa de óleo; ^d Valor real; ^{pc} Ponto central.

4.2.10. Reuso da lipase livre na síntese de ésteres etílicos sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas

O reuso da lipase livre foi realizado através da aplicação direta em um novo ciclo de reação da fase aquosa obtida ao final do ensaio, que foi realizado sob as condições que forneceram o melhor resultado em ésteres. Ao término da reação, o frasco foi deixado em repouso para favorecer a separação entre as fases aquosa e orgânica e, em seguida, a fase orgânica foi retirada e um novo meio de reação foi adicionado à fase aquosa sem tratamento prévio (REN *et al.*, 2011).

Para isto, a composição de ambas as fases obtidas ao final de cada ciclo de reação foi inicialmente analisada. O glicerol e o etanol presente nas duas fases foram quantificados através da metodologia do item 4.2.12 e o teor de etanol encontrado na fase aquosa foi considerado no ajuste da razão molar etanol:óleo. Já a determinação dos teores de ésteres e a análise dos teores de ácidos graxos livres presentes na fase aquosa foram realizadas após a lavagem desta com hexano: 1 mL de hexano foi adicionado a 1 mL da fase aquosa e esta mistura foi cetrifugada a 10000 rpm (11428,6 G) por 10 min; posteriormente, a fase rica em hexano foi levada à evaporação sob pressão reduzida a 70 °C e os teores de ácidos graxos livres foram determinados através da metodologia AOCS Ca 5a-40, enquanto que o teor de ésteres foi quantificado de acordo com o item 4.2.11. Estes teores de EEAG e de AGL da fase aquosa foram determinados e subtraídos dos valores quantificados nos produtos finais, de modo a obter o valor real dos componentes produzidos em cada ciclo de reuso.

4.2.11. Cromatografia de permeação em gel e cromatografia a gás para análise dos ésteres alquílicos

A conversão de triacilgliceróis em monoésteres foi avaliada por cromatografia de permeação em gel (CPG) em um cromatógrafo Waters® modelo 1515 com amostrador automático modelo 2707 e uma coluna Ultrastyrigel 2000 (Waters) seguida de uma coluna TSK-Gel G1000-HXL (Tosoh Bioscience®), ambas precedidas por uma pré-coluna Tosoh HXL-L (Tosoh Bioscience) mantidas a 40 °C. Tetraidrofurano grau HPLC (Tedia®) foi utilizado como fase móvel a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹.

O volume das injeções foi de 20 µL para tempos de análise de 25 min e os componentes das amostras foram detectados por refratometria diferencial. A quantificação dos componentes foi realizada por calibração externa usando-se os seguintes padrões de referência para tri-, di- e monoacilgliceróis: trioleína, dioleína e monoleína. Além disso, a quantificação dos ésteres foi realizada utilizando como referência uma mistura dos ésteres de ácidos graxos mais encontrados no óleo de soja, com os seguintes padrões: estearato de etila (4,7%), linoleato de etila (36,2%), linolenato de etila (2,1%), oleato de etila (28,9%) e palmitato de etila (28,2%). A faixa de concentração das curvas de calibração variou de 0,16 a 5,0 mg mL⁻¹.

O perfil composicional em monoésteres foi realizado por cromatografia de fase gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC). O cromatógrafo Shimadzu GC-2010 Plus com amostrador automático AOC-20i foi utilizado para esta determinação. Foram adicionados 1 mL de heptano às amostras (5 mg) e um volume de 1 µL destas foi injetado em modo de divisão de

amostra de 1:20. A eluição utilizou hélio como gás de arraste a 1 mL min^{-1} . As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250°C e as programações de temperatura do forno e da coluna foram matriciais, iniciando-se em 120°C onde permaneceu por 2 min, seguido de aquecimento a $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até 180°C onde ficou por 3 min e depois a 5°C min^{-1} até 240°C finalizando com um estágio isotérmico nesta temperatura por 10 min, totalizando 33 min de corrida cromatográfica. A análise foi realizada em uma coluna Agilent CPWAX 52CB (30 m x 0,32 mm; $0,25 \mu\text{m}$). As curvas de calibração e os fatores de resposta do detector de ionização de chama foram determinados a partir de padrões cromatográficos dos ésteres e a quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando nonadecanoato de metila como padrão interno (faixa de concentração de 0,127 a $2,04 \text{ mg mL}^{-1}$) de acordo com o método EN 14103:2011 (CEN, 2011).

4.2.12. Determinação de glicerol e etanol

A determinação de glicerol e de etanol do meio de reação contendo a enzima livre foi realizada nas duas fases (fase orgânica e fase aquosa) formadas ao término da reação. Alíquotas de 1 mL da fase orgânica foram lavadas com 1 mL de água deionizada e centrifugadas a 10000 rpm ($11428,6 \text{ G}$) durante 10 min e a fase aquosa foi diluída em água deionizada. A determinação de glicerol e de etanol foi realizada em um sistema de cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu modelo LC10AD, provido de um amostrador automático SIL10A, desgaseificador de fase móvel modelo DGU 14A, forno de aquecimento de coluna modelo CTO 10A e detector modelo RID10A para índice de refração. A análise foi realizada em coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) a 65°C , precedida por pré-coluna Cátion-H e eluída com uma solução de H_2SO_4 5 mmol L^{-1} como fase móvel a uma vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. A quantificação foi efetuada por padronização externa, baseada em uma curva de calibração com sete pontos que se encontram na faixa de concentração de 0,037 a $2,4 \text{ mg mL}^{-1}$.

4.2.13. Análise estatística dos estudos univariados e multivariados

O tratamento estatístico dos dados oriundos dos estudos univariados foi realizado no programa GraphPad Prism 5 utilizando-se o teste de Tukey (nível de confiança de 95%). Já a análise dos dados dos planejamentos multivariados e a obtenção das superfícies de resposta, dos diagramas de Pareto e dos parâmetros estatísticos da análise de variância simples (ANOVA) foram realizadas no programa Statistica 8.0, utilizando como respostas os teores de ésteres e de

ácidos graxos livres dos produtos. A validação dos modelos matemáticos foi obtida através da realização de um experimento em duplicata nas condições ótimas preditas para cada modelo e da comparação de seus resultados com o valor previsto pelo modelo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da matéria graxa

As propriedades do óleo de soja refinado (OSR) empregado nas reações foram determinadas e estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Análise de parâmetros físicos e químicos do óleo de soja refinado.

Parâmetro analisado	OSR
Teor de Ácidos Graxos Livres (% ácido oleico) ^a	0,13 ± 0,02
Índice de Acidez (mg KOH g ⁻¹ amostra) ^a	0,25 ± 0,02
Teor de Água (% m m ⁻¹) ^b	0,08 ± 0,01
Índice de Saponificação (mg KOH g ⁻¹ amostra) ^c	186,81 ± 0,23
Massa Molar (g mol ⁻¹) ^c	900,91

^a AOCS Ca 5a-40; ^b AOCS Ca 2e-84; ^c AOCS Cd 3-25.

O teor de água do OSR foi avaliado devido a sua influência sobre a obtenção do produto de interesse. A água é importante no processo, pois pode influenciar tanto pela hidratação da lipase e manutenção de sua conformação ativa, quanto pela alteração do equilíbrio entre as reações catalisadas pela enzima (hidrólise ou síntese de ésteres). O valor obtido para o teor de água foi de 0,08% e este está de acordo com os dados relatados por outros autores, como Garcia (2006) que encontrou 0,10% e Gomes *et al.* (2003) que demonstraram a presença de 0,084% de água em óleo de soja refinado.

A acidez do OSR foi mensurada porque as lipases são capazes de conduzir a reação de esterificação dos ácidos graxos livres presentes no óleo, o que eleva o teor de água no meio de reação. O índice de acidez representa a quantidade de KOH em mg necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1 g de amostra, enquanto que o teor de ácidos graxos livres é expresso pela porcentagem (em massa) de ácidos graxos livres em relação a um ácido graxo de referência (ácido oleico). O teor de ácidos graxos livres do OSR foi de 0,13%, o que correspondeu a um índice de acidez de 0,25 mg KOH g⁻¹ de amostra. Estes valores de acidez estão próximos aos encontrados na literatura para o óleo de soja refinado; por exemplo, teores de ácidos graxos livres de 0,04% e de 0,07% foram encontrados por Garcia (2006) e Vidrih *et al.* (2010) neste mesmo produto, respectivamente.

O índice de saponificação é utilizado para determinar a quantidade da matéria graxa que é passível de conversão em monoésteres. O valor encontrado para o OSR foi de 186,81 mg KOH g⁻¹ de amostra, o que está de acordo com valores tabelados pela ANVISA (180 – 200 mg KOH g⁻¹ de amostra) (ANVISA, 1999). Esta quantificação foi utilizada para o cálculo da massa molar dos triacilgliceróis do OSR e o valor obtido foi de 900,91 g mol⁻¹. Sendo assim, foi possível estabelecer a concentração molar de substrato a ser utilizada em todas as reações e, a partir disto, ajustar as demais variáveis.

Garcia (2006) estudou um óleo de soja refinado cuja massa molar era de 875,3 g mol⁻¹ e Encinar *et al.* (2007) encontraram 873,4 g mol⁻¹ para este mesmo parâmetro. A variação da massa molar de óleos da mesma fonte (soja) está relacionada a diferenças na sua composição em ácidos graxos, que é resultado das condições edafoclimáticas e práticas de cultivo a que a planta foi exposta durante o ciclo de crescimento e, também, da sua variabilidade genética, pois se alterando a região e a época do ano, diferentes variedades de soja podem ser cultivadas. Além disso, esta pequena diferença pode estar associada a erros intrínsecos associados a esta análise (GOMES *et al.*, 2003).

A análise da composição percentual em ácidos graxos do OSR foi realizada (Tabela 5) e o seu perfil cromatográfico está apresentado na Figura 11.

Tabela 5. Descrição dos ácidos graxos observados no perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados do óleo de soja refinado.

EMAG ^a	tr ^b	Cn:m ^c	OSR ^d
Palmitato	13,98	C16:0	10,44 ± 0,01
Estearato	16,53	C18:0	3,66 ± 0,02
Oleato	16,78	C18:1 <i>E</i>	1,30 ± 0,01
Oleato	16,95	C18:1 <i>Z</i>	23,80 ± 0,01
Linoleato	17,27	C18:2 <i>E</i>	1,29 ± 0,01
Linoleato	17,70	C18:2 <i>Z</i>	54,41 ± 0,11
Araquidonato	17,59	C20:0	0,22 ± 0,01
Eicoseinato	18,34	C20:1	0,27 ± 0,01
Behenato	18,63	C22:0	0,25 ± 0,04
Linolenato	18,70	C18:3	4,93 ± 0,01
Tricosenoato	22,45	C23:0	0,38 ± 0,04
Outros	-	-	0,32

^aÉsteres metílicos de ácidos graxos; ^bTempo de retenção em minutos; ^cNúmero de carbonos na cadeia alquílica dos ácidos graxos; duplas ligações; ^dPercentual mássico de ésteres do óleo de soja refinado.

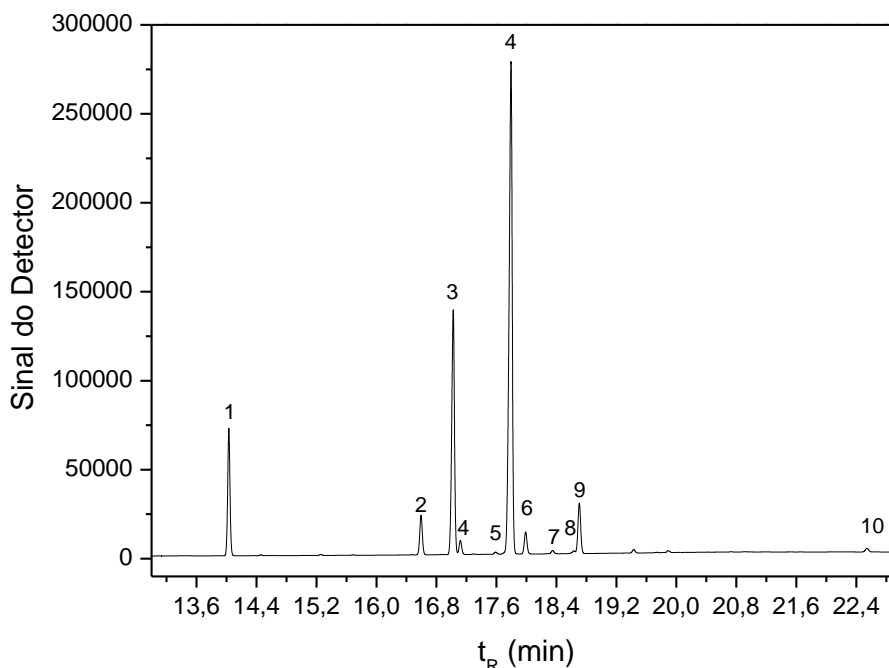


Figura 11. Perfil cromatográfico dos ésteres metílicos derivados do óleo de soja refinado: (1) palmitato, (2) estearato, (3) oleato, (4) linoleato, (5) araquidonato, (6) padrão interno, (7) eicoseinato, (8) behenato, (9) linolenato, e (10) tricosenoato de metila.

Observa-se que os ácidos graxos componentes do óleo de soja estão de acordo com os dados encontrados na literatura (GARCIA, 2006; AUED-PIMENTEL *et al.*, 2009). Estes dados indicam que o óleo de soja possui grande quantidade de ácidos graxos insaturados, com predominância dos ácidos linoleico (55,70%), oleico (25,10%) e linolênico (4,93%) e de ácidos graxos saturados, sendo 10,44% de palmítico e 3,66% de esteárico. A elevada quantidade de ácidos graxos insaturados é indesejada em alguns casos, visto que a presença de ligações duplas pode tornar o óleo e, conseqüentemente, os ésteres dele obtidos mais suscetíveis a processos oxidativos. No entanto, isto pode ser contornado pela adição de antioxidantes. Por outro lado, a presença de um conteúdo significativo de ácidos graxos saturados seria desvantajosa, pois acarretaria em uma provável piora das propriedades de fluxo a frio do combustível (DOMINGOS *et al.*, 2008; VIDRIH *et al.*, 2010).

5.2. Determinação das atividades de hidrólise e síntese de ésteres das lipases de *Candida antarctica* B

A medida da atividade de hidrólise de uma lipase é um indicativo de seu desempenho catalítico (MANJÓN *et al.*, 1991). No caso deste trabalho, cujo objetivo é aprimorar a síntese

de ésteres etílicos, o conhecimento da capacidade hidrolítica das lipases é essencial pela possibilidade desta provocar uma redução nos rendimentos do produto desejado. Desta forma, as atividades hidrolíticas das lipases de *C. antarctica* B, livre e imobilizada em resina poliacrílica, foram determinadas em meio aquoso e em meio orgânico. Já o estudo do desempenho de lipases na síntese de ésteres pode ser feito pela medida de sua atividade de esterificação, através de um procedimento padronizado para a reação em meio orgânico (ALNOCH, 2013).

O teor de proteínas da lipase Novozym 435 não é conhecido, uma vez que o seu protocolo de imobilização não é informado. Portanto, para a obtenção de dados comparativos aos obtidos para a enzima livre, expressos em teor de proteínas, a quantificação das proteínas totais presentes na Novozym 435 foi realizada após a extração das proteínas do suporte de imobilização, que foi feita através de dois procedimentos distintos. O primeiro procedimento de extração empregou dimetilsulfóxido (DMSO), visto que este é um solvente aprótico e polar no qual as enzimas têm alta solubilidade; o emprego desta metodologia permitiu a extração de 0,024 mg de proteínas por g de Novozym 435. O segundo método empregou o detergente sulfato de dodecila (SDS). Este detergente tem a propriedade de dessorver proteínas ligadas a um suporte por interações hidrofóbicas, muitas vezes desnaturando a sua atividade biológica. Assim, o uso deste método proporcionou uma dessorção de 0,28 mg de proteínas por g de Novozym 435, o que o caracteriza como um tratamento mais eficiente para este propósito.

Diversos autores já relataram a extração de proteínas do suporte de Novozym 435 (Lewatit VP OC 1600) com detergentes. Por exemplo, Cabrera *et al.* (2009) demonstraram através de medidas de atividade residual que o detergente Triton X-100 foi capaz de promover a remoção total das proteínas do suporte de imobilização da Novozym 435 e Izquierdo *et al.* (2014), através da obtenção de espectros de infravermelho com transformada de Fourier acoplada à técnica de reflexão total atenuada (ATR-FTIR), comprovaram a remoção das proteínas de Novozym 435 utilizando o detergente SDS, demonstrando que a imobilização ocorre principalmente através de interações hidrofóbicas. Portanto, o valor de 0,28 mg de proteínas foi utilizado para os cálculos de atividade específica da lipase Novozym 435 expressa em relação à quantidade de proteínas totais (Tabela 6). Na Tabela 6 também estão apresentados os valores de atividade específica da lipase livre expressos por g de proteína total e da Novozym 435 por g de suporte.

A determinação de proteínas na enzima livre sem tratamento proporcionou um valor de 26,22 mg de proteína por mL de solução e, para a mesma enzima após diálise, foi encontrado 31,39 mg de proteína por mL de solução (34,46 mg de proteína por g de solução). Isto indica

que a enzima livre contém uma parcela de interferentes que comprometem a determinação de proteínas totais. Tais interferentes se referem aos estabilizantes adicionados à formulação da enzima livre, que são principalmente o glicerol e o sorbitol. Hämäläinen e Lönnberg (1991) citaram que monossacarídeos, glicosídeos e polióis formam complexos razoavelmente estáveis com íons metálicos em solução aquosa e Briggs et al. (1981) demonstraram que o glicerol e o sorbitol complexam os íons Cu^{2+} . Desta forma, considerando que o método de BCA consiste na redução de Cu^{2+} a Cu^{+1} pelas proteínas em condições alcalina (NOYES et al., 2014), a presença de tais contaminantes reduz a sensibilidade do método. Já o teor de proteínas da Novozym 435 após extração com SDS foi de 0,28 mg por g de catalisador, o que demonstra que uma mesma massa de CalB livre conteria muito mais enzima disponível para catalisar as reações. Portanto, a comparação das atividades entre as lipases livre e imobilizada foi realizada em relação ao teor de proteínas totais, já que expressar a atividade da enzima imobilizada por grama do material suportado levaria à subestimação do seu potencial catalítico.

Tabela 6. Atividades enzimáticas das lipases livre e imobilizada.

Atividade na:	CalB L	Novozym 435	
		Sem tratamento	Com tratamento ^d
Hidrólise em meio aquoso (U g^{-1})	$2266,11 \pm 1,80^a$	$0,35 \pm 0,01^b$	$1,26 \pm 0,20^c$
Hidrólise em meio orgânico (U g^{-1})	$29,55 \pm 7,67^a$	$65,34 \pm 0,06^b$	$223,25 \pm 0,01^c$
Esterificação em meio orgânico (U g^{-1})	$0,06 \pm 1,10^a$	$206,30 \pm 4,58^b$	$8463,21 \pm 0,11^c$

^a Unidades de atividade enzimática por g de proteína total (determinado pelo método de BCA); ^b Unidades de atividade enzimática por g de suporte; ^c Unidades de atividade enzimática por g de proteína total (determinado pelo método de BCA, após extração do suporte); ^d Valores da coluna anterior calculados em relação ao teor de proteínas totais obtido a partir da extração com SDS (mg g^{-1} de suporte).

As medidas em meio aquoso demonstraram que a atividade de hidrólise da CalB livre foi de $2266,11 \text{ U g}^{-1}$, muito superior às medidas da lipase imobilizada, que apresentou $0,35 \text{ U g}^{-1}$ de suporte e $1,26 \text{ U g}^{-1}$ de proteína, o que se deve ao fato do processo de imobilização tornar o meio aquoso inadequado para a atividade da enzima imobilizada. Como já relatado por Hama *et al.* (2011), a água pode adsorver no suporte da enzima, impedindo o acesso do substrato ao sítio catalítico. Já as medidas em meio orgânico demonstraram que as atividades hidrolíticas da lipase imobilizada foram de $65,34 \text{ U g}^{-1}$ e $223,25 \text{ U g}^{-1}$, em relação à massa de biocatalisador e

à massa de proteínas nela contidas, respectivamente, valores superiores ao da enzima livre, que foi de 29,55 U g⁻¹. Tais resultados sugerem que, em um meio aquorrestrito, a adição da CalB na forma livre pode promover a sua separação do meio orgânico, limitando seu acesso ao substrato e fazendo com que esta apresente menor atividade nestes meios (VERMA *et al.*, 2008).

As atividades de esterificação em meio orgânico da Novozym 435 foram de 206,03 U g⁻¹ de suporte e de 8463,21 U g⁻¹ de proteínas, indicando sua capacidade de catalisar reações de síntese de ésteres. A lipase livre nestas mesmas condições apresentou um valor de 0,06 U g⁻¹, o que demonstra a sua baixa atividade de esterificação nestes meios, corroborando com o que foi citado por Ren *et al.* (2011) de que lipases na forma livre necessitam de mais água no meio reacional para realizarem a catálise eficientemente, já que esta depende de sua hidratação e dobramento na estrutura tridimensional cataliticamente ativa. Ademais, a mistura de água e lipídio leva à formação de emulsões, que são necessárias para a ativação interfacial da lipase, enquanto que a enzima livre em meio aquorrestrito tende a ser segregada do meio orgânico e formar agregados que impedem o contato efetivo dos substratos com o sítio ativo (SECUNDO *et al.*, 2001). Já a lipase imobilizada não necessita de água adicional no sistema de reação porque a manutenção de sua conformação ativa já ocorre devido ao teor de água presente no seu suporte de imobilização (1,92% m m⁻¹). Assim, em meio orgânico, esta lipase tem a capacidade de manter a sua atividade e promover conversões mais satisfatórias em tempos de reação mais curtos (MANJÓN *et al.*, 1991; DENG *et al.*, 2005; FORESTI *et al.*, 2005; CHESTERFIELD *et al.*, 2012).

As diferentes atividades apresentadas pela CalB (livre e imobilizada) estão associadas com o procedimento de imobilização (suporte ou condições) da enzima. Na Novozym 435, a lipase de *C. antarctica* B está imobilizada em uma resina acrílica polimérica macroporosa de caráter moderadamente polar (Lewatit OC VP 1600) através de um protocolo desenvolvido e protegido pela Novozymes (CHEN *et al.*, 2008; IZQUIERDO *et al.*, 2014). Mei *et al.* (2003) afirmaram que a imobilização neste suporte ocorre principalmente através de interações hidrofóbicas, pois esta pode ser desorvida da resina acrílica por incubação com detergentes e solventes orgânicos. Além disso, a imobilização pode envolver algum outro tipo de interação entre a enzima e o suporte porque o procedimento de produção da Novozym 435 não é totalmente conhecido e diferentes tipos de interação enzima-suporte alteram o microambiente da enzima, modificando as suas propriedades catalíticas. Desta forma, a mesma enzima, nas formas livre e imobilizada, apresenta diferentes comportamentos quando utilizadas em um

mesmo meio de reação (MARTY *et al.*, 1997; MEI *et al.*, 2003; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; CABRERA *et al.*, 2009).

5.3. Síntese de ésteres de etila pela lipase livre sob aquecimento convencional

5.3.1. Efeito da água na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em sistema livre de solventes

A quantidade de água utilizada em reações enzimáticas é um fator determinante e pequenas variações no seu conteúdo podem provocar grandes modificações na atividade enzimática. As lipases em meios aquorrestritos, ou seja, na presença de solventes orgânicos, atuam na síntese de ésteres. Apesar disto, a água é indispensável para manter a enzima ativa (MANJÓN *et al.*, 1991; FORESTI *et al.*, 2005). Neste sentido, avaliou-se o efeito da água na obtenção de ésteres etílicos através de um estudo que foi baseado na adição de diferentes percentuais de água (m m^{-1}) em relação ao óleo. As condições reacionais empregadas foram: razão molar etanol:óleo de 3:1 e 5% de enzima em relação à massa de óleo a 40 °C e 150 rpm por 8 h de reação. Os resultados obtidos nestes ensaios encontram-se na Figura 12.

A água presente na solução da enzima livre foi de $51,06 \pm 1,03\%$ e este valor, somado à contribuição da água presente no etanol, correspondeu a 0,3% de água no meio de reação. A partir dos resultados apresentados na Figura 12 é possível observar que, apesar do conteúdo de água presente no preparado enzimático, a ocorrência da síntese de ésteres com apenas 0,3% de água no meio é muito baixa. Isto pode estar relacionado à desativação da lipase causada pelo excesso etanol em um sistema com conteúdo de água limitado (REN *et al.*, 2011). Além disso, o fato do acréscimo de água ao sistema ter aumentado o teor de ésteres do produto final também está associado à remoção do glicerol do meio orgânico onde estão os substratos da reação e sua migração para o meio aquoso, deslocando o equilíbrio em favor da síntese de ésteres.

A adição de água ao meio também afeta o equilíbrio termodinâmico entre as reações catalisadas pela lipase livre, pois esta é capaz de hidrolisar as ligações éster tanto do substrato quanto do produto formado. Dessa forma, foi analisada a ocorrência de hidrólise e, ao final de 8 h de reação, observou-se que as amostras onde a água foi adicionada ao meio de reação apresentavam teores de AGL mais elevados. Assim, constata-se que, além de ocasionar o aumento na velocidade de reações de síntese de ésteres, as condições do meio de reação também promoveram a hidrólise.

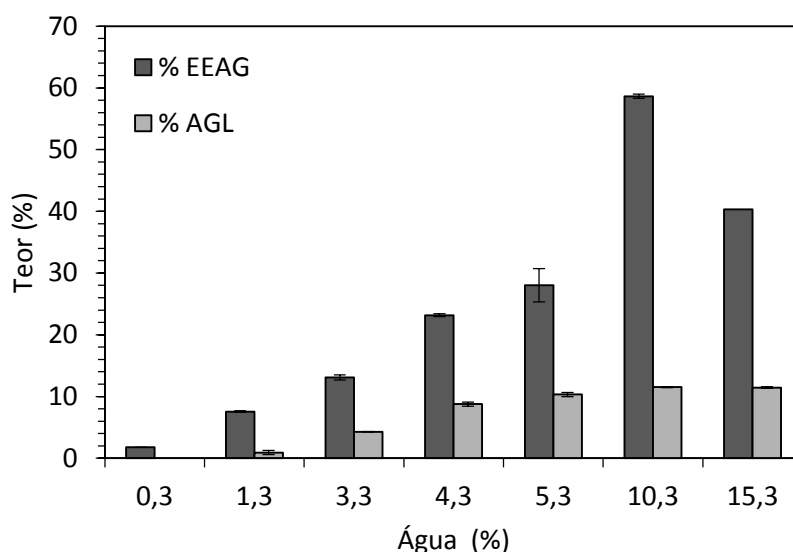


Figura 12. Efeito da adição de água sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em 8 h de reação.

Este incremento da conversão a ésteres etílicos em consequência do acréscimo do percentual de água presente no meio de reação, acompanhado de um aumento da ocorrência de hidrólise, já havia sido observado por Secundo *et al.* (2001), que demonstraram que as atividades da lipase CalB, tanto de hidrólise como de transesterificação, aumentam em função do conteúdo de água devido à formação de uma emulsão no sistema. Considerando que as lipases em sistemas aquosos catalisam reações na interface da emulsão formada entre lipídio e água, a obtenção desta é essencial para sua atuação. Deste modo, a qualidade da emulsão formada é relevante, pois quanto maior a área interfacial, mais substrato estará disponível para a reação (JAEGER e REETZ, 1998; YANG *et al.*, 2006).

Como observado na Figura 12, ao aumentar o teor de água de 10,3% para 15,3%, a conversão em ésteres diminuiu e a hidrólise se manteve nos mesmos níveis, conforme demonstrado pelo teste de Tukey no intervalo de confiança de 95%. Esta última constatação se deve ao fato de que os valores de índice de acidez obtidos para estes intervalos não apresentaram diferença entre si. Assim, pode-se dizer que existe um limite para a concentração de água neste meio de reação, porque, de acordo com Pedersen *et al.* (2014), após o conteúdo ótimo de água para estabilização da estrutura da enzima ser atingido, o acréscimo de água no meio é prejudicial, pois o etanol, por ser polar, seria deslocado para a fase aquosa do sistema, o que diminui sua disponibilidade para realizar a reação.

O conteúdo ótimo de água encontrado nestas condições foi de 10,3% em relação à massa de óleo. Posteriormente, foi realizado o monitoramento desta reação por um período de 24 h (Figura 13) com a finalidade de propiciar o alcance de teores de ésteres superiores.

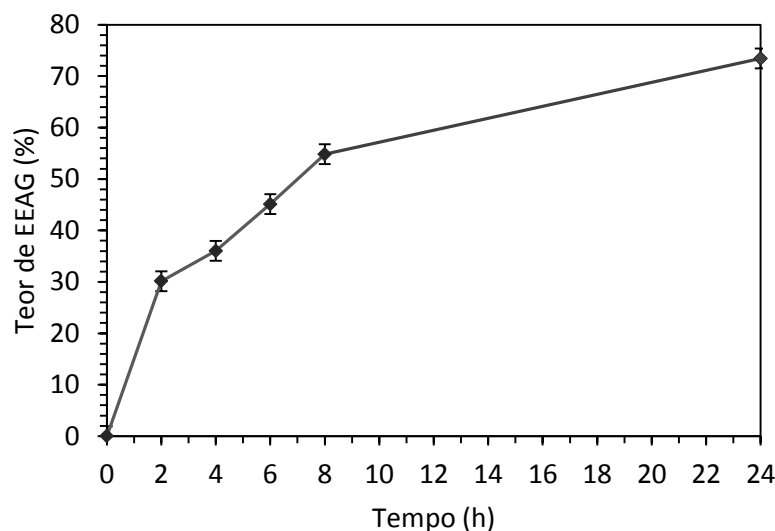


Figura 13. Monitoramento da etanolise do óleo de soja catalisada pela lipase livre com 10,3% de água adicionada no meio de reação.

Como demonstrado na Figura 13, a produção de ésteres alcançou teores de até 30% em 2 h e, após 24 h, o teor de ésteres encontrado no produto final foi de 73,4%, apontando que, além da água, outros parâmetros necessitam de otimização para que maiores teores de ésteres sejam obtidos em tempos de reação mais curtos.

Neste mesmo ensaio observou-se a formação de uma emulsão durante o processo de conversão, após aproximadamente 1 h do início da reação. Cessada a agitação do sistema, houve a formação de duas fases, sendo a fase superior constituída em sua maior parte de tri-, di- e monoacilgliceróis, ésteres e ácidos graxos, que foi denominada de fase orgânica, e a fase inferior composta por uma emulsão formada entre enzima, água e glicerol, chamada de fase aquosa. O teor de glicerol nas duas fases foi determinado durante o período de 24 h e, conforme apresentando na Figura 14, a maior quantidade de glicerol permaneceu na fase aquosa durante todo o processo. Isto confirma que a reação de alcoólise é favorecida pela transferência do glicerol para a fase aquosa, pois desta forma o equilíbrio na fase orgânica, onde há concentração dos substratos, está sendo deslocado no sentido da formação dos produtos (MA e HANNA, 1999).

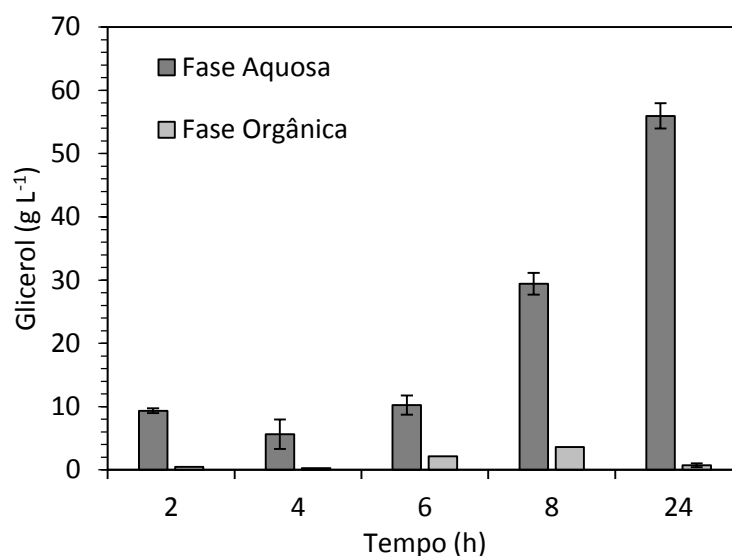


Figura 14. Distribuição nas fases orgânica e aquosa da glicerina formada na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre com 10,3% de água adicionada ao meio.

5.3.2. Efeito do solvente (hexano) na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre

Particularmente para reações de transesterificação catalisadas por lipases, alguns autores têm defendido a viabilidade do uso de solventes apolares, como o hexano e o heptano, devido à melhora na solubilidade do álcool e do óleo e à diminuição do contato do etanol com a lipase, que ocasionam maior velocidade na produção de ésteres e aumentam a estabilidade do biocatalisador (QIN *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009; BAJAJ *et al.*, 2010). Deste modo, é relevante avaliar a influência da adição de um solvente nas reações catalisadas por lipases. Para tanto, hexano foi empregado em reações de etanólise nas seguintes condições reacionais: razão molar de 3:1 etanol:óleo, 5% de enzima em relação a massa de óleo, 10,3% de água (m m^{-1}) e 10% de solvente (m m^{-1}) a 40 °C e 150 rpm. Os resultados são apresentados na Figura 15.

Tal comportamento é interessante porque o emprego de solventes orgânicos é desvantajoso econômica e ambientalmente e o processo pode ser realizado em um sistema livre de solventes, o que diminui etapas processuais como a necessidade de sua recuperação ao final da reação. Além disso, o uso de solventes orgânicos apresenta outras desvantagens como sua volatilidade, inflamabilidade e toxicidade, que dificulta sua eventual aplicação em escala industrial (DOSSAT *et al.*, 2002; SHIMADA *et al.*, 2002; SHAH e GUPTA, 2007; ADACHI *et al.*, 2013).

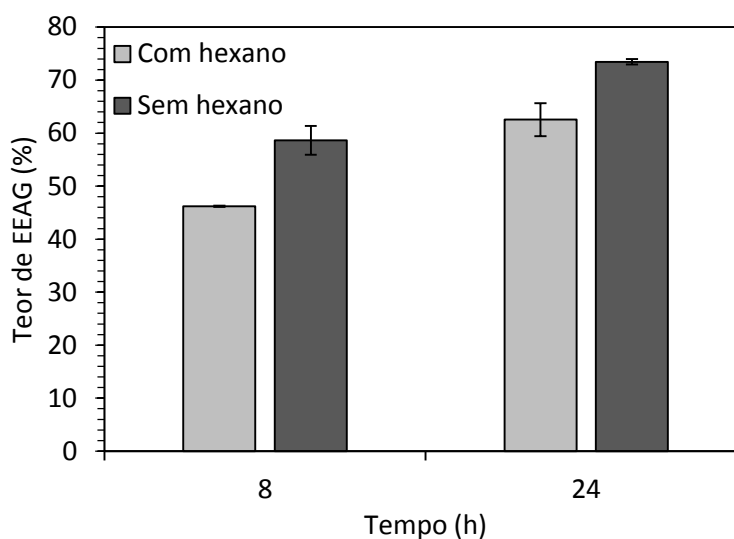


Figura 15. Efeito da utilização de 10% de hexano sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre na presença de 10,3% de água.

5.3.3. Efeito da razão molar etanol:óleo na etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em sistema livre de solventes

As reações de síntese de ésteres são reversíveis e os seus rendimentos dependem do deslocamento do seu equilíbrio químico em favor da formação dos ésteres, que pode ser realizado através do emprego de um excesso estequiométrico de um dos reagentes como, neste caso, o etanol (MA e HANNA, 1999). Entretanto, em processos enzimáticos, o uso de elevadas concentrações de álcoois de cadeia curta é prejudicial, pois estes podem causar a inativação da lipase (SHIMADA *et al.*, 2002). Para o estudo do efeito da razão molar etanol:óleo sobre a catálise realizada pela enzima livre, as condições reacionais empregadas foram de: 5% de enzima (m m^{-1}), 10,3% de água (m m^{-1}), 40 °C e 150 rpm, com tempo de reação de 8 h. Os resultados encontram-se apresentados na Figura 16.

Os resultados da Figura 16 demonstram que a produção de ésteres etílicos foi significativamente influenciada pela mudança da razão molar etanol:óleo. A razão molar de 3:1 permitiu a obtenção do maior conteúdo em ésteres (56,7%), no entanto, o teor de AGL nesta condição foi também maior em comparação com as outras razões molares estudadas. Cheirsilp *et al.* (2008) demonstraram que o aumento da concentração inicial de etanol promove um decréscimo na concentração final de ácidos graxos livres devido ao deslocamento do equilíbrio termodinâmico em favor da transesterificação. Isto porque, nesta situação, as constantes de velocidade para a alcoólise são muito mais elevadas do que para a reação de hidrólise.

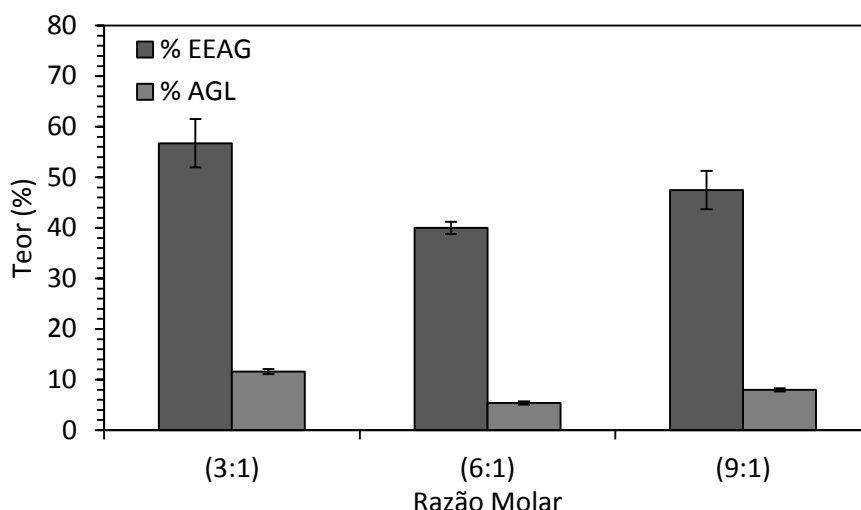


Figura 16. Efeito da razão molar etanol:óleo sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em 8 h de reação.

O aumento da razão molar para 6:1 e para 9:1 causou uma diminuição no teor de ésteres e também na acidez final do produto em relação aos valores obtidos com razão molar de 3:1. O fato de elevadas razões molares terem efeitos negativos sobre as reações de hidrólise e (trans)esterificação catalisadas pela lipase está provavelmente relacionado à sua desativação, que implicou na redução de sua atividade catalítica (SHIMADA *et al.*, 2002; YADAV e DEVI, 2004; AL-ZUHAIR *et al.*, 2007). Ren *et al.* (2011) demonstraram que razões molares etanol:óleo acima de 5:1 são desvantajosas para a produção de ésteres catalisada por lipases livres, particularmente devido a sua inativação. No entanto, a razão molar de 9:1 proporcionou um aumento nos teores de ésteres e de AGL em relação a de 6:1, o que é justificado pela melhoria na solubilidade dos reagentes, uma vez que o etanol proporciona uma melhor mistura entre óleo, etanol e água. Além disso, uma vez que a composição do meio de reação está em contante mudança, a solubilidade do álcool é também alterada, fazendo com que o impacto do etanol sobre a enzima mude ao longo do tempo (ZHOU e BOOCOOCK, 2006; CHEIRSILP *et al.*, 2008).

5.4. Pré-otimização multivariada da síntese de ésteres etílicos pela lipase livre sob aquecimento convencional

Os estudos para a produção de biodiesel por via enzimática têm focado principalmente na avaliação dos processos via planejamentos experimentais univariados. Porém, há também a necessidade de avaliação das interações entre as variáveis que afetam o sistema reacional, uma

vez que estas interações são muito importantes para o entendimento dos processos. Desta forma, a influência das variáveis razão molar etanol:óleo, porcentagem de água (m m^{-1}) e quantidade de enzima (m m^{-1}) foi avaliada através de um planejamento multivariado. Os teores de ésteres etílicos e de ácidos graxos livres de cada ponto do planejamento estão contidos na Tabela 7.

O ponto central do planejamento (ensaios 9 e 10) foi realizado em duplicata e permitiram a obtenção de uma estimativa do erro experimental, cujo desvio padrão foi de 1,66% para o teor de ésteres e de 0,28% para o teor de ácidos graxos livres, indicando o nível de repetibilidade e confiabilidade destes dados. Os resultados obtidos para teores de ésteres e de AGL foram então submetidos à análise de variância (Tabela 8). Os modelos desenvolvidos apresentaram pequena falta de ajuste frente a um nível de confiança de 95%, fato confirmado pelos valores de F para regressão e resíduos e pelos altos valores de R^2 explicado, de 0,943 para teor de ésteres e de 0,982 para teor de AGL, que representam parte significativa dos valores de porcentagem máxima de variância explicável, que foram de 0,987 e 0,992, respectivamente. Isto expressa que 94,3% e 98,2% da variância foram explicadas pelos modelos propostos para teores de EEAG e de AGL, respectivamente, garantindo-lhes uma boa previsibilidade.

Tabela 7. Respostas expressas em teor de ésteres etílicos e de ácidos graxos livres obtidos para o planejamento experimental multivariado para a etanólise catalisada pela lipase livre.

ENSAIO	ENZ (%) ^a	RM ^b	Água (%) ^c	EEAG (%) ^d	AGL (%) ^e
1	3	3:1	10,3	49,7	10,6
2	7	3:1	10,3	73,8	12,8
3	3	9:1	10,3	35,5	5,1
4	7	9:1	10,3	65,9	6,1
5	3	3:1	20,3	61,6	13,3
6	7	3:1	20,3	69,4	15,3
7	3	9:1	20,3	41,8	6,1
8	7	9:1	20,3	35,9	3,8
9 ^{pc}	5	6:1	15,3	56,4	8,4
10 ^{pc}	5	6:1	15,3	58,8	8,8

^a Porcentagem de enzima em relação a massa de óleo; ^b Razão molar etanol:óleo; ^c Porcentagem de água em relação a massa de óleo; ^d Teor de ésteres etílicos de ácidos graxos totais (m m^{-1}); ^e Teor de ácidos graxos livres da amostra calculado pela metodologia AOCS Ca 5a-40, expresso como percentual em ácido oleico (m m^{-1}); ^{pc} Ponto central.

As condições do planejamento que proporcionaram os maiores teores em ésteres no produto (ensaios 2 e 6) tiveram como semelhança o fato de empregarem a maior concentração de enzima (7%, m m^{-1}) e a menor razão molar (3:1). Já em relação aos teores de AGL, o ponto 2 exibiu uma menor ocorrência de hidrólise no meio quando comparado ao ponto 6, indicando que o valor de 10,3% de água é mais adequado para a síntese de ésteres. Então, diagramas de

Pareto foram construídos para a análise dos efeitos das variáveis independentes e de suas interações sobre respostas como o teor de ésteres (Figura 17A) e teor de ácidos graxos livres (Figura 17B) do produto final.

Tabela 8. Parâmetros estatísticos obtidos pela análise de variância (ANOVA) das respostas expressas em teor de ésteres etílicos e teor de ácidos graxos livres do planejamento experimental multivariado, elaborado para a etanólise catalisada pela lipase livre sob aquecimento convencional.

Fator	SQ^a	GL^b	MQ^c	F^d	F_{tab}
<i>Teor de EEAG</i>					
Regressão	1665,44	6	277,57	25,97	19,33
Resíduos	21,38	2	10,69		
Falta de Ajuste	18,50	1	18,50	6,42	161,40
Erro Puro	2,88	1	2,88		
Total SQ	1686,82	10	168,68		
<i>Teor de AGL</i>					
Regressão	134,10	6	22,35	82,43	19,33
Resíduos	0,54	2	0,27		
Falta de Ajuste	0,46	1	0,46	5,78	161,40
Erro Puro	0,08	1	0,08		
Total SQ	134,64	10	13,46		

^a Soma dos Quadrados; ^b Graus de Liberdade; ^c Média dos Quadrados; ^d Variância.

A razão molar foi a única variável significativa a um nível de confiança de 95% que apresentou um efeito negativo sobre a produção de ésteres etílicos de -15,71 p.p. (Figura 17A). Como dito anteriormente, isto ocorre porque o etanol é um forte agente para a desativação de lipases (ANTCZAK *et al.*, 2009). Portanto, elevadas concentrações deste álcool no meio de reação podem provocar a redução da atividade enzimática. Todavia, a Figura 17B indica que a razão molar tem influência negativa muito mais significativa sobre o índice de acidez do produto, de -38,20 p.p., quando se aumenta a razão molar etanol:óleo de 3:1 para 9:1, sendo que as outras variáveis e suas interações não foram estatisticamente significativas no mesmo nível de confiança.

O efeito negativo da razão molar sobre o teor de AGL foi observado anteriormente por Cheirsilp *et al.* (2008), que constataram que o aumento da concentração inicial de etanol diminui o conteúdo final de ácidos graxos livres. Estes autores estudaram faixas de razão molar etanol:óleo de 0,5:1 a 6:1 em um sistema contendo 10% de água (m m⁻¹) e notaram que o efeito do etanol sobre o aumento no teor de ésteres e diminuição nos ácidos graxos livres foi significativo apenas até razões molares de 4:1, quando o equilíbrio da reação foi atingido. Porém, estes autores fizeram uma modelagem cinética da produção de ésteres utilizando uma

lipase de outra fonte (*Pseudomonas sp.*). Já neste trabalho, os dados da Tabela 7 e da Figura 17B indicam que, independentemente da quantidade de enzima e do teor de água utilizado, a acidez final do produto decresceu gradativamente com o aumento da razão molar.

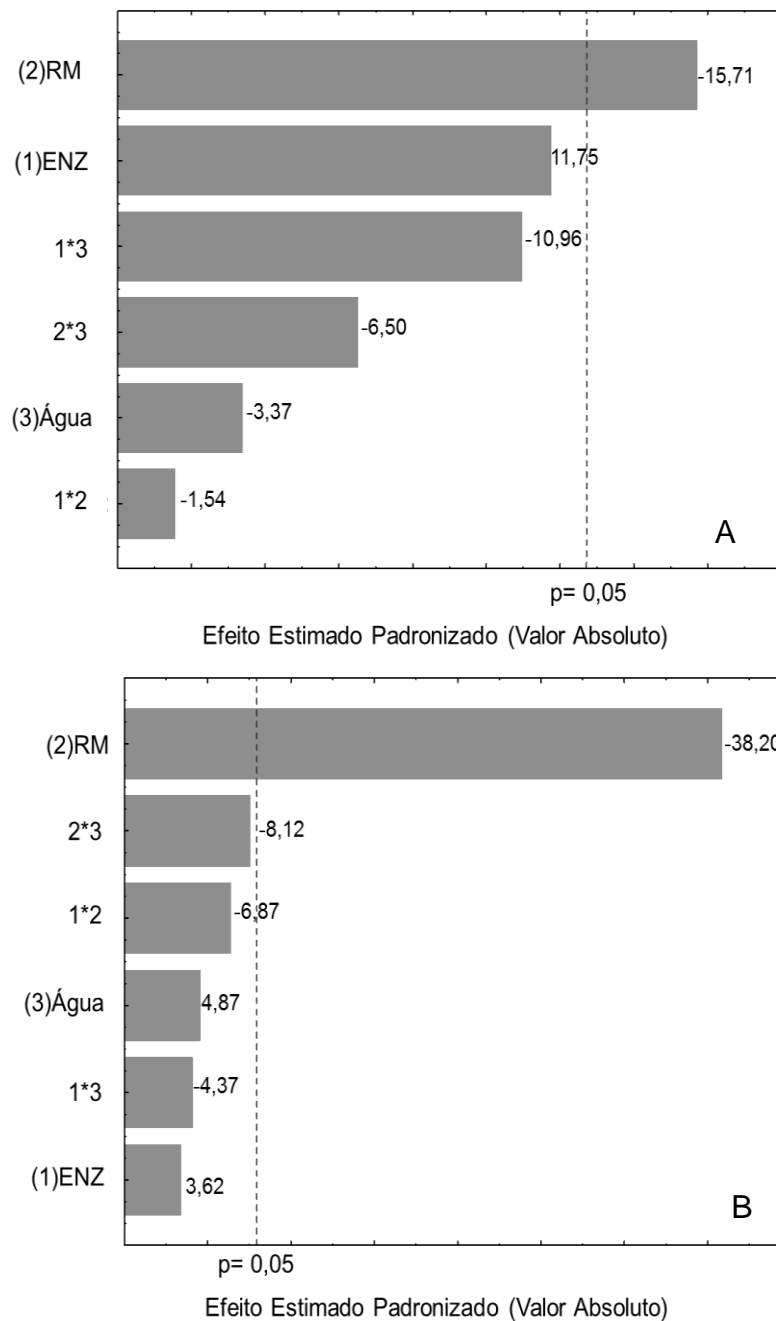


Figura 17. Diagrama de Pareto para a resposta expressa em (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres das variáveis estudadas para a etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre.

Os resultados desta etapa do trabalho confirmaram o observado pelos estudos univariados de que elevados conteúdos de etanol causam a inativação da lipase e desfavorecem

as reações de hidrólise. A ilustração deste efeito do etanol sobre os teores de esteres e de AGL pode ser visualizada nas superfícies de resposta da Figura 18, que foram construídas a partir das Equações 1 e 2,

$$EEAG = -16,490 + 1,607RM + 4,442ÁGUA - 0,154(5)(RM) - 0,657(5)(ÁGUA) - 0,260(RM)(ÁGUA) + 72,549$$

Equação 1

$$AGL = 2,601 + 0,114MR + 0,641(ÁGUA) - 0,115(5)(RM) - 0,044(5)(ÁGUA) - 0,054(RM)(ÁGUA) + 7,691$$

Equação 2

onde *EEAG* e *AGL* são os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos totais (m m^{-1}) e os teores de ácidos graxos livres, expresso como percentual em ácido oleico (m m^{-1}), respectivamente, *RM* representa a razão molar etanol:óleo e *ÁGUA* é o teor de água (% em relação à massa de óleo).

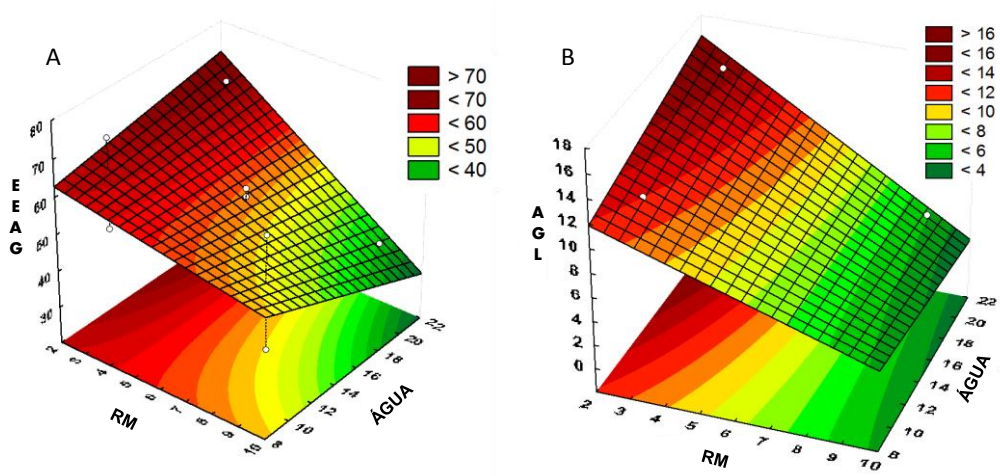


Figura 18. Superfície de resposta da etanólise catalisada pela lipase livre sob aquecimento convencional para a relação razão molar etanol:óleo *versus* água (% m m^{-1}), com os resultados expressos em (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres.

A Figura 18A demonstra que o teor em ésteres diminuiu à medida que a concentração de etanol no meio aumentou e, ainda, que a produção de ésteres diminuiu com o aumento no teor de água do meio. Já para os índices de acidez, a Figura 18B mostra um efeito similar causado pela concentração de etanol, o que indica que altas razões molares etanol:óleo são desfavoráveis as reações catalisadas pela CalB L.

A validação dos modelos matemáticos propostos para prever variações nos teores de ésteres e de AGL do produto foi obtida pela realização de experimentos em duplicata na condição do planejamento experimental que favoreceu a maior produção de ésteres. O valor predito pelo modelo para este ponto foi de 77,0% de EEAG e o valor obtido experimentalmente foi de $74,8 \pm 0,1\%$. Já para o modelo do teor de AGL o valor previsto era de 12,7% de AGL e o experimental foi de $11,7 \pm 0,1\%$. Com isto, pode-se dizer que ambos os modelos gerados são válidos para descrever as tendências observadas no sistema.

5.5. Otimização da razão molar etanol:óleo e do teor de água na síntese de ésteres etílicos pela lipase livre sob aquecimento convencional

Tendo em vista que a maioria dos resultados que envolvem elevados teores em ésteres também apresentam teores de ácidos graxos livres elevados, uma estratégia para otimizar a produção de ésteres com menor contaminação por ácidos graxos livres foi a alteração da razão molar e do teor de água nas reações. Conforme apontaram os resultados dos experimentos univariados e do planejamento multivariado, o teor de ésteres de 73,8% foi obtido com uma razão molar etanol:óleo de 3:1 e 10,3% de água no meio, mas, nesta condição, o teor de AGL do produto foi de 12,8%. Como a razão molar tem efeitos negativos sobre a produção de ésteres e de ácidos graxos livres e, também, a quantidade de enzima não é uma variável significativa para a otimização da reação, esta etapa do trabalho visou avaliar o acréscimo da razão molar para 4:1 e a variação do teor de água para valores abaixo de 10,3%, mantendo-se o conteúdo de enzima em 5% (m m^{-1}). Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 19.

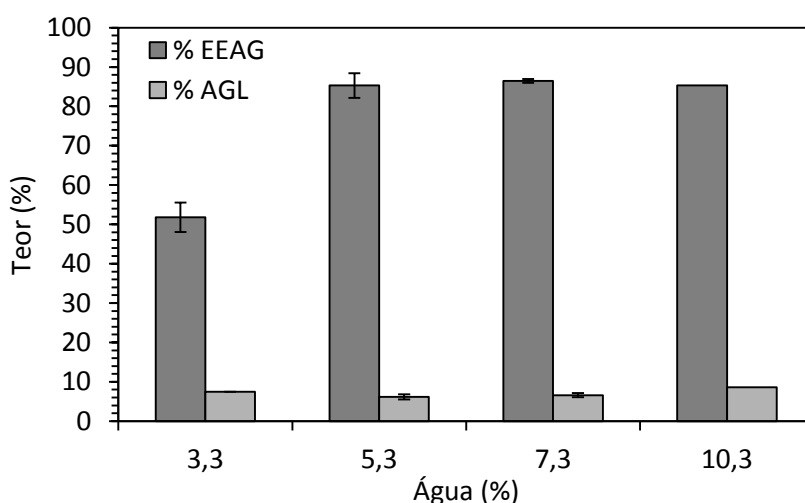


Figura 19. Efeito da variação do teor de água e razão molar etanol:óleo de 4:1 sobre os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres do produto da etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre em 8 h de reação.

Houve uma influência positiva do aumento da razão molar etanol:óleo de 3:1 para 4:1 e este comportamento está relacionado ao deslocamento do equilíbrio da reação à formação de produto. Além disso, com o aumento da razão molar de 3:1 para 4:1 com teor de água de 10,3%, a tendência à hidrólise diminuiu porque o teor de AGL passou de 11,6% para 8,6%, o que revela que a razão molar de 4:1 é mais satisfatória para favorecer a síntese de ésteres em detrimento às reações de hidrólise.

Como apresentado na Figura 19, teores de água abaixo de 5,3% não foram suficientes para promover as reações de síntese, visto que com 3,3% de água o teor de ésteres foi de apenas 51,8%. Durante estes ensaios observou-se que com a razão molar de 4:1 e os teores de água de 5,3%, 7,3% e 10,3% havia a formação de uma única fase no sistema, que consistia de uma forte emulsão. Porém, com 3,3% de água esta emulsão não era gerada, portanto, a atividade catalítica não era distribuída em todo o volume da reação, mas restrita à interface entre as fases orgânica e aquosa, desfavorecendo as reações catalisadas pela lipase, além de não permitir a mistura favorável entre os reagentes (YANG *et al.*, 2006).

O teste de Tukey em um nível de confiança de 95% foi realizado para avaliar os teores de ésteres obtidos e observou-se que não existem diferenças significativas entre os valores obtidos com 10,3%, 7,3% e 5,3% de água. Por outro lado, o teste de Tukey aplicado para os teores de AGL indicou que o maior valor obtido com 10,3% de água, foi significativamente diferente dos obtidos com 7,3% e 5,3%. Ainda, apesar do aumento do teor de água de 3,3% para 5,3% e 7,3%, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os seus respectivos teores de AGL.

Com base nestes dados, nota-se que, com razão molar etanol:óleo de 4:1 e teores de água de 5,3% e 7,3%, as reações de hidrólise foram menos favorecidas e foi possível obter elevados teores em ésteres. Paralelamente, o aumento na produção de EEAG aumentou o conteúdo de glicerol no meio, o que dificultou as reações de hidrólise. Pedersen *et al.* (2014) demonstraram que o glicerol pode dificultar a hidrólise por apresentar uma interação específica com a enzima e, assim, o excesso de água presente no meio não chega às imediações de seu sítio ativo, reduzindo a formação de ácidos graxos livres (TAMAYO *et al.*, 2012).

5.6. Pré-otimização multivariada da síntese de ésteres etílicos pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional

O comportamento da enzima imobilizada foi estudado através da avaliação de algumas variáveis do processo, como a quantidade de enzima, a razão molar etanol:óleo e a porcentagem

de água, com o emprego de um planejamento fatorial. Na Tabela 9 estão exibidos os resultados expressos em relação ao teor de ésteres do produto final.

Tabela 9. Teor de ésteres etílicos obtidos pela etanólise catalisada pela lipase imobilizada nas condições delineadas pelo planejamento experimental multivariado.

ENSAIO	ENZ (%)	RM ^b	Água (%) ^c	EEAG (%) ^d
1	3	6:1	0,3	36,7
2	7	6:1	0,3	53,7
3	3	12:1	0,3	29,3
4	7	12:1	0,3	48,4
5	3	6:1	1,3	9,9
6	7	6:1	1,3	15,4
7	3	12:1	1,3	22,0
8	7	12:1	1,3	37,4
9 ^{pc}	4,5	9:1	0,8	33,2
10 ^{pc}	4,5	9:1	0,8	33,5
11 ^{pc}	4,5	9:1	0,8	39,3

^a Porcentagem de enzima em relação a massa de óleo; ^b Razão molar etanol:óleo; ^c Porcentagem de água em relação à massa de óleo; ^d Teor de ésteres etílicos de ácidos graxos totais (m m^{-1}); ^{pc} Ponto central.

Os ensaios 2 e 4 apresentaram os melhores resultados em ésteres etílicos totais no produto final de 53,7% e 48,4%, respectivamente, com a vantagem de não ter havido a formação de quantidades significativas de ácidos graxos livres no meio devido à baixa atividade de hidrólise da lipase Novozym 435. Os valores obtidos para teores de ésteres foram inferiores aos obtidos com o emprego da enzima livre, o que indica que as variáveis avaliadas não foram otimizadas, bem como o tempo de reação. As condições mais satisfatórias dentre os níveis estudados foram as de maior concentração de enzima ($7\% \text{ m m}^{-1}$) sem a adição de água ao sistema. Já o desvio padrão calculado com base nos dados de teor em ésteres dos ensaios 9, 10 e 11 foi de apenas 3,4%.

As respostas do planejamento expressas em teor de ésteres foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e os parâmetros estatísticos obtidos estão listados na Tabela 10. O modelo apresentou valores de F aceitáveis para regressão e resíduos em um nível de confiança de 95%, demonstrando a adequação do modelo proposto aos dados experimentais. Ademais, a variância máxima explicável do modelo foi de 0,940, mas o valor obtido para o R^2 explicado foi de 0,863. Então, a influência das variáveis e de suas interações foi avaliada através de um gráfico de Pareto (Figura 20).

A Figura 20 mostra que o teor de água apresentou um efeito negativo de -8,58 p. p. sobre a produção de ésteres etílicos, o que é justificado pelo fato do teor de água presente na lipase

Novozym 435 ser suficiente para a manutenção de sua estrutura ativa. Assim, a água adicionada em excesso provavelmente permaneceu nos poros do suporte em que a enzima é imobilizada, uma vez que este apresenta polaridade moderada, dificultando a transferência do substrato hidrofóbico do meio reacional para o interior do biocatalisador onde o sítio catalítico da enzima se encontra (MARTY *et al.*, 1997; CHAMOULEAU *et al.*, 2001; HAMA *et al.*, 2011). Chesterfield *et al.* (2012) observaram este efeito negativo na reação de etanolise catalisada por Novozym 435 quando conduziram a reação com a adição de 2% de água em relação à massa de óleo e concluíram que, devido a baixa solubilidade dos triacilgliceróis em água, a difusão do substrato hidrofóbico para o sítio ativo da lipase foi dificultada.

Tabela 10. Parâmetros estatísticos obtidos por análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial elaborado para a etanolise catalisada pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional, tendo a resposta expressa em teor de ésteres etílicos do produto final.

Fator	SQ ^a	GL ^b	MQ ^c	F ^d	F _{tab}
Regressão	1617,39	6	269,56	11,18	6,16
Resíduos	96,47	4	24,12		
Falta de Ajuste	72,84	2	36,42	3,08	19,00
Erro Puro	23,63	2	11,81		
Total SQ	1713,85				

^a Soma dos Quadrados; ^b Graus de Liberdade; ^c Média dos Quadrados; ^d Variância.

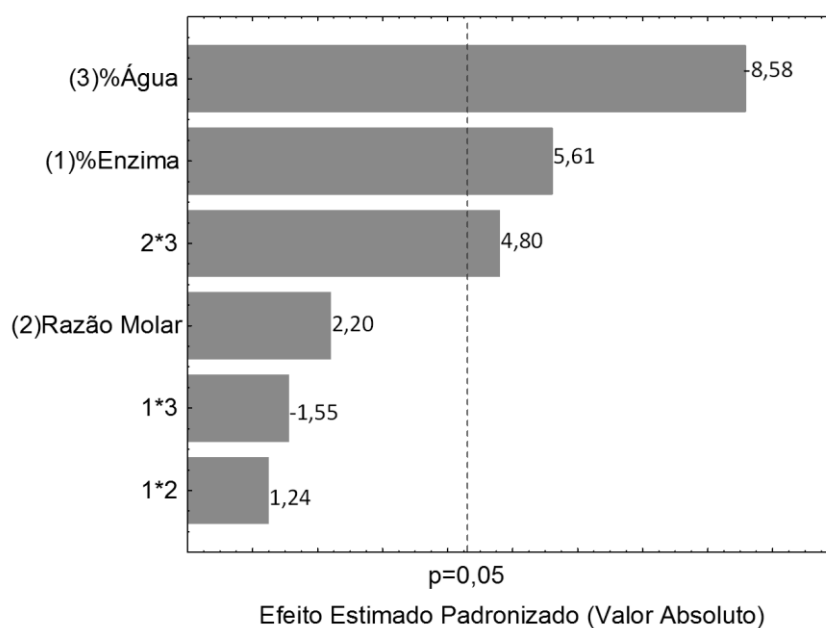


Figura 20. Diagrama de Pareto das variáveis estudadas na etanolise do óleo de soja catalisada pela lipase imobilizada, com a resposta expressa em teor de ésteres etílicos do produto final.

Outro fator significativo foi a concentração de enzima, que influenciou positivamente (5,61 p.p.) na obtenção de ésteres, pois o aumento de 3 a 7% da quantidade de enzima em relação à massa de óleo proporciona o aumento da disponibilidade de sítios cataliticamente ativos para o processo de conversão (HERNÁNDEZ-MARTÍN e OTERO, 2008). Estes dados são semelhantes aos obtidos por Chen *et al.* (2009), que observaram que para a reação de metanólise de óleo residual de fritura, o conteúdo de ésteres aumentou a medida que a quantidade de Novozym 435 foi elevada de 5% a 25% em relação à massa de óleo.

Os efeitos das duas variáveis mais significativas (água e enzima) sobre o teor de ésteres do produto final podem ser visualizados também na superfície de resposta da Figura 21, que foi construída a partir da Equação 3,

$$EEAG = 56,575 + 2,648ENZ - 46,450 \text{ ÁGUA} + 0,250(9)(ENZ) - 1,900(\text{ÁGUA})(ENZ) + 3,900(9)(\text{ÁGUA}) - 31,305$$

Equação 3

onde *EEAG* é o teor de ésteres etílicos de ácidos graxos totais (m m^{-1}), *ENZ* representa a porcentagem de enzima (% em relação à massa de óleo) e *ÁGUA* é o teor de água (% em relação à massa de óleo).

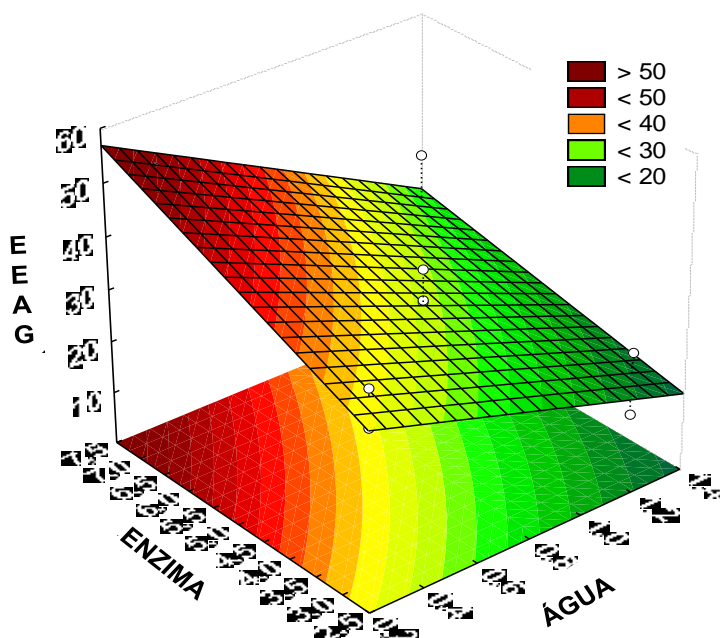


Figura 21. Superfície de resposta dos fatores enzima (% m m^{-1}) versus água (% m m^{-1}) para os resultados expressos como teor de ésteres para o planejamento experimental da etanólise catalisada pela lipase imobilizada sob aquecimento convencional.

A validação do modelo matemático proposto para prever variações nos teores de ésteres etílicos foi obtida pela realização de um experimento em duplicata na condição do planejamento experimental que favoreceu o maior teor em EEAG. O valor predito pelo modelo para este ponto era de 53,8% de EEAG e o valor obtido experimentalmente foi de 59,6%. Com isto, pode-se dizer que o modelo gerado é válido para descrever as tendências observadas no sistema.

O estudo dos processos conduzidos sob aquecimento convencional demonstrou que existem diferenças entre o comportamento das lipases comerciais de *C. antarctica* B, livre e imobilizada, em sistemas reacionais de síntese de ésteres etílicos. Tais diferenças são referentes à tolerância destas enzimas aos conteúdos de água e etanol no meio de reação. A enzima livre apresentou maior sensibilidade a elevados teores de etanol porque este causa sua inativação, porém, foi capaz de catalisar reações de síntese de ésteres com um conteúdo de até 20,3% de água no meio. Já para a enzima imobilizada, a presença de água diminuiu a eficiência catalítica na síntese de ésteres porque o suporte da Novozym 435 é capaz de adsorver água em sua superfície, impedindo assim o acesso do substrato ao sítio catalítico. Quanto ao etanol, a Novozym 435 não sofreu efeitos negativos devido a sua presença em altas concentrações e isto é relacionado ao fato da enzima livre se encontrar mais acessível, o que permite a maior interação desta com o etanol. Quando imobilizada, a estrutura da enzima fica mais rígida e sofre menos os efeitos de inativação causados pelo etanol (MACEIRAS *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Apesar de ser difícil estabelecer uma correlação entre as duas enzimas em termos de atividade enzimática ou carga proteica, a pré-otimização dos parâmetros reacionais dos ensaios de etanólise, conduzidos por 8 h com a CalB L, proporcionou teores de ésteres de até 73,8%. Este valor foi bastante superior ao obtido com a Novozym 435 (53,7%), mas apresentou o inconveniente da formação de 12,8% de ácidos graxos livres no produto final. Para solucionar tal questão, a razão molar foi aumentada para 4:1 e isto proporcionou uma melhora na produção de ésteres para 85,3% e uma diminuição no teor de AGL para 8,6%. A fim de diminuir ainda mais a formação de AGL, foi investigado o efeito de menores teores de água no meio (3,3, 5,3 e 7,3%), visto que a presença de conteúdos superiores tem resultado no aumento das taxas de hidrólise. Assim, com 5,3% de água no meio, o mesmo conteúdo em ésteres foi alcançado, porém, com 6,1% de ácidos graxos livres no produto final. Isto demonstrou que, mesmo com a obtenção de um produto com elevado conteúdo de ésteres, ainda haveria a necessidade de remover os ácidos graxos livres presentes, o que pode ser realizado com o uso de resinas de troca iônica, alumina ativada, carvão ativado ou sílica (BERRIOS e SKELTON, 2008). Já o planejamento realizado para a etanólise catalisada por Novozym 435 indicou que para

aprimorar a produção de ésteres etílicos é necessário reduzir o teor de água presente no meio de reação.

5.7. Pré-otimização da síntese de ésteres etílicos pelas lipases livre e imobilizada sob aquecimento de micro-ondas

A irradiação de micro-ondas como fonte de aquecimento do sistema foi utilizada com o objetivo de favorecer a produção de ésteres etílicos em menores tempos de reação. Para isto, foi conduzido um teste preliminar no reator de micro-ondas com a enzima imobilizada, empregando as melhores condições do planejamento realizado com aquecimento convencional (ensaio 2, Tabela 9). Tais condições permitiram alcançar um teor em ésteres de 53,7% em 8 h de reação.

No ensaio feito com o aquecimento de micro-ondas observou-se que em 1 h de reação não houve conversão a ésteres que, em 4 h o teor de ésteres foi de apenas 0,37% e que em 8 h este valor aumentou para 15,3%. Ademais, houve desestruturação do suporte da enzima (Figura 22), o que poderia justificar a baixa produção de ésteres neste sistema. Este fenômeno pode ser atribuído à alta absorção de energia pelo etanol e pela natureza química do suporte da Novozym 435, que é moderadamente polar, gerando seu superaquecimento e assim motivando a sua desestruturação.

O etanol presente no meio de reação tem a capacidade de ocasionar a desestruturação do suporte em que a enzima Novozym 435 é imobilizada, uma vez que a difusão do álcool para o interior do suporte altera a textura interior dos grânulos, gerando canais e aumentando a rugosidade do material polimérico (JOSÉ *et al.*, 2011). Além disso, estes autores apresentaram que o etanol modificou a estrutura secundária da enzima, alterando sua atividade catalítica e dificultando o seu reuso. No entanto, estes resultados foram relatados para reações realizadas sob aquecimento convencional.

Estudos sobre os efeitos da irradiação de micro-ondas em reações de etanólise empregando a lipase Novozym 435 em sistemas livres de solventes são escassos. Por exemplo, Nogueira *et al.* (2010) investigaram a etanólise do óleo de macaúba assistida por micro-ondas utilizando Novozym 435 em um meio livre de solventes e observaram que o tempo de reação é um fator que influencia negativamente na produção de ésteres. Todavia, neste estudo não foram avaliadas a possibilidade de reuso e as causas da diminuição da atividade do biocatalisador ao longo da reação, como possíveis alterações na estrutura e propriedades do suporte.

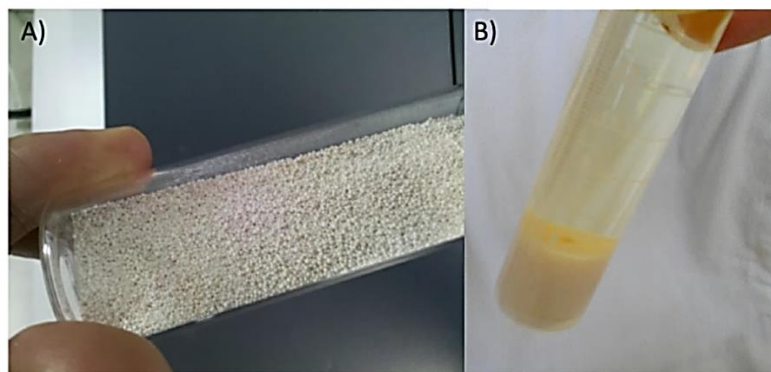


Figura 22. (A) Enzima Novozym 435 antes do uso, (B) meio de reação após 8 h de reação catalisada pela enzima imobilizada sob irradiação de micro-ondas (fase inferior: concentração do suporte desestruturado).

Yu *et al.* (2010) utilizaram a enzima Novozym 435 para a metanólise do óleo de soja em reator de micro-ondas na presença de *tert*-butanol. Nas melhores condições [*tert*-butanol:óleo de 1:1 ($v\ v^{-1}$), razão molar metanol:óleo de 6:1 e 3% de enzima a 40 °C] foi alcançado um rendimento de 94% em 12 h e a enzima foi reutilizada por 5 ciclos reacionais sem perdas significativas de sua atividade. Porém, neste sistema deve-se levar em consideração que o uso do solvente deve ter exercido um efeito positivo sobre a estabilização do catalisador.

Com base nisto, optou-se por estudar apenas o comportamento da enzima livre no reator de micro-ondas, o que foi avaliado primeiramente através de um teste empregando as melhores condições do planejamento realizado com aquecimento convencional (ensaio 2, Tabela 7), em que o teor de ésteres obtido foi de 73,8% em 8 h de reação e o teor de AGL foi de 12,8%. Quando a reação foi assistida por irradiação de micro-ondas, observou-se que os teores de ésteres etílicos e de ácidos graxos livres foram de 47,9% e 8,7% em apenas 1 h de reação, respectivamente, o que representa 65% dos teores obtidos em 8 h sob agitação orbital. Por conseguinte, a enzima livre foi escolhida para a pré-otimização do processo de produção de ésteres sob irradiação de micro-ondas.

O planejamento experimental utilizado continha as seguintes variáveis: porcentagem de enzima ($m\ m^{-1}$), razão molar etanol:óleo e porcentagem de água ($m\ m^{-1}$). Além disso, foram realizados outros dois experimentos nas condições que proporcionaram os maiores teores em ésteres (ensaio 3), um sob aquecimento de micro-ondas sem adição de enzima (ensaio 17) e outro sob aquecimento convencional (ensaio 18). O teor de ésteres totais e o teor de AGL para todos os ensaios realizados estão contidos na Tabela 11.

Tabela 11. Teores de ésteres etílicos de ácidos graxos e de ácidos graxos livres obtidos em reações de etanolíse catalisadas pela lipase livre sob aquecimento convencional e de micro-ondas, empregando 1 h de reação.

ENSAIO	RM ^a	Água (%) ^b	ENZ (%) ^c	EEAG (%) ^d	AGL (%) ^e
1	3:1	10,3	3	33,5	9,6
2	9:1	10,3	3	28,4	1,4
3	3:1	20,3	3	61,6	12,3
4	9:1	10,3	3	35,6	1,4
5	3:1	10,3	7	47,9	8,7
6	9:1	10,3	7	31,3	1,9
7	3:1	20,3	7	56,3	11,2
8	9:1	20,3	7	28,6	2,1
9 ^{pc}	6:1	15,3	5	18,9	1,9
10 ^{pc}	6:1	15,3	5	22,7	2,4
11	3:1	15,3	5	57,4	14,1
12	9:1	15,3	5	39,8	2,1
13	6:1	10,3	5	26,8	2,4
14	6:1	20,3	5	29,5	2,1
15	6:1	15,3	3	37,0	3,5
16	6:1	15,3	7	33,8	4,4
17 ^f	3:1	20,3	0	0,0 [*]	0,5
18 ^g	3:1	20,3	3	21,4	14,7

^aRazão molar etanol:óleo; ^bPorcentagem de água em relação à massa de óleo; ^cPorcentagem de enzima em relação à massa de óleo; ^dÉsteres etílicos de ácidos graxos (m m^{-1}); ^eTeor de ácidos graxos livres calculado pela metodologia AOCS Ca 5a-40, expresso como % em ácido oleico (m m^{-1}); ^fEnsaio realizado em micro-ondas sem catalisador; ^gExperimento realizado em agitador orbital (40 °C e 150 rpm); ^{pc}Ponto central do planejamento experimental; ^{*}Não foram detectados picos referentes a ésteres nas análises cromatográficas.

A adequação dos dados experimentais aos modelos propostos foi confirmada pelos resultados obtidos por análise de variância (ANOVA) (Tabela 12), em que foram observados valores adequados de F para regressão e resíduos, além da baixa falta de ajuste.

Os resultados referentes aos pontos centrais do planejamento (ensaios 9 e 10) apresentaram um desvio padrão de apenas 2,69% e 0,35% para as respostas expressas em teor de ésteres e teor de AGL, respectivamente, o que é uma estimativa da baixa ocorrência de erros experimentais e da boa repetibilidade dos dados. Os valores de R² de 0,781 para os teores de ésteres e de 0,929 para os teores de AGL, cujos valores de máxima porcentagem de variância explicável foram de 0,883 e 0,962, respectivamente, indicam que boa parte da variância dos dados obtidos é explicada pelo modelo.

Os diagramas de Pareto apresentam os valores dos efeitos das variáveis e suas interações nas respostas teor de EEAG (Figura 23A) e teor de AGL (Figura 23B). A única variável de efeito significativo sobre o teor de ésteres no nível de confiança de 95% foi a razão molar etanol:óleo, em suas formas linear (L) e quadrática (Q). Já que o efeito da razão molar (L)

apresentou uma contribuição de -23,11 p.p. na produção de ésteres. Entretanto, a variação da razão molar de forma quadrática (Q) demonstrou um efeito positivo de 21,22 p.p. sobre o teor de ésteres, enquanto que, para a resposta expressa em teor de AGL, o mesmo comportamento foi observado. Neste caso, a forma linear da razão molar (L) teve um efeito negativo muito superior de -70,06 p.p. e a contribuição da razão molar em sua forma quadrática (Q) foi positiva em 34,68 p.p.. Ademais, outras variáveis e suas interações não foram significativas no mesmo intervalo de confiança.

Tabela 12. Parâmetros estatísticos obtidos pela análise de variância (ANOVA) das respostas expressas em teores de ésteres etílicos e de ácidos graxos livres do planejamento experimental multivariado, elaborado para a etanolise catalisada pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas.

Fator	SQ^a	GL^b	MQ^c	F^d	F_{tab}
<i>Teor de EEAG</i>					
Regressão	2071,92	6	345,32	10,08	3,58
Resíduos	273,94	8	34,24		
Falta de Ajuste	272,32	7	38,90	24,01	161,40
Erro Puro	1,62	1	1,62		
Total SQ	2345,86	22	106,63		
<i>Teor de AGL</i>					
Regressão	282,79	6	47,13	34,10	3,58
Resíduos	11,06	8	1,38		
Falta de Ajuste	11,01	7	1,57	34,96	161,40
Erro Puro	0,04	1	0,04		
Total SQ	293,84	22	13,36		

^a Soma dos Quadrados; ^b Graus de Liberdade; ^c Média dos Quadrados; ^d Variância.

A influência destas variáveis nas respostas em teores de ésteres e de ácidos graxos livres foram confirmadas pela construção de superfícies de respostas (Figura 24), que foram construídas a partir das Equações 4 e 5,

$$EEAG = 30,052 - 20,417RM + 1,752(RM)^2 + 8,450ÁGUA - 0,187(ÁGUA)^2 - 0,267(RM)(ÁGUA) + 0,073(5)(RM) - 0,050(5)(ÁGUA)$$

Equação 4

$$AGL = 9,878 - 6,897RM + 0,477(RM)^2 + 2,340ÁGUA - 0,062(ÁGUA)^2 - 0,042(RM)(ÁGUA) + 0,048(5)(RM) - 0,017(5)(ÁGUA)$$

Equação 5

onde *EEAG* e *AGL* são os teores de ésteres etílicos de ácidos graxos totais (m m^{-1}) e de ácidos graxos livres, expresso como percentual em ácido oleico (m m^{-1}), respectivamente, *RM* representa a razão molar etanol:óleo e *ÁGUA* é o teor de água (% em relação à massa de óleo).

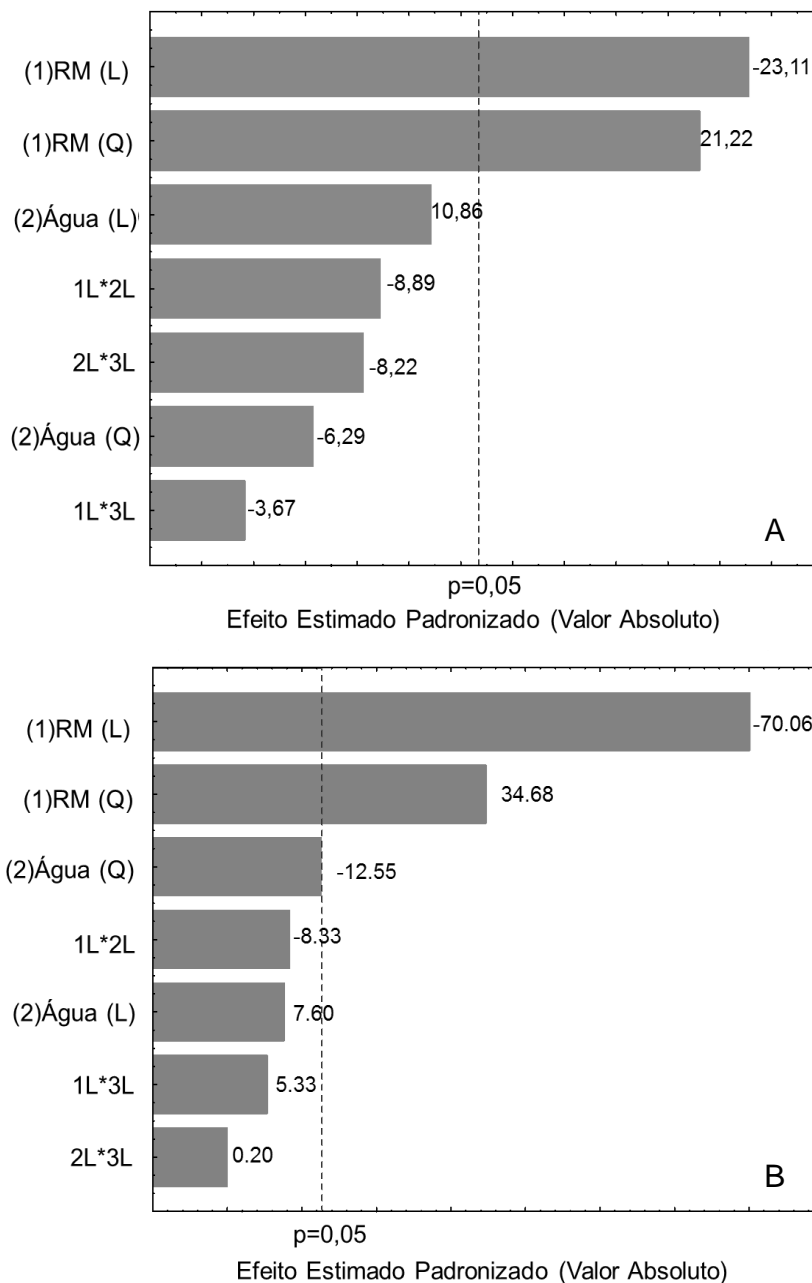


Figura 23. Diagrama de Pareto para a resposta expressa em (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres das variáveis estudadas para a etanólise do óleo de soja catalisada pela lipase livre sob irradiação de micro-ondas.

As superfícies de resposta da Figura 24 ilustram que a tendência dos resultados obtidos é descrita pelo modelo quadrático. Ademais, é possível notar que a síntese de ésteres tem melhores resultados com concentrações de etanol mais baixas. No entanto, nestas condições o

conteúdo de ácidos graxos livres também se eleva, demonstrando que o aumento na síntese de ésteres está associado ao incremento da produção de ácidos graxos livres. Com base nisto, foi demonstrado que no sistema aquecido por irradiação de micro-ondas também há necessidade de otimização da reação de maneira a favorecer a síntese de ésteres e diminuir as reações de hidrólise.

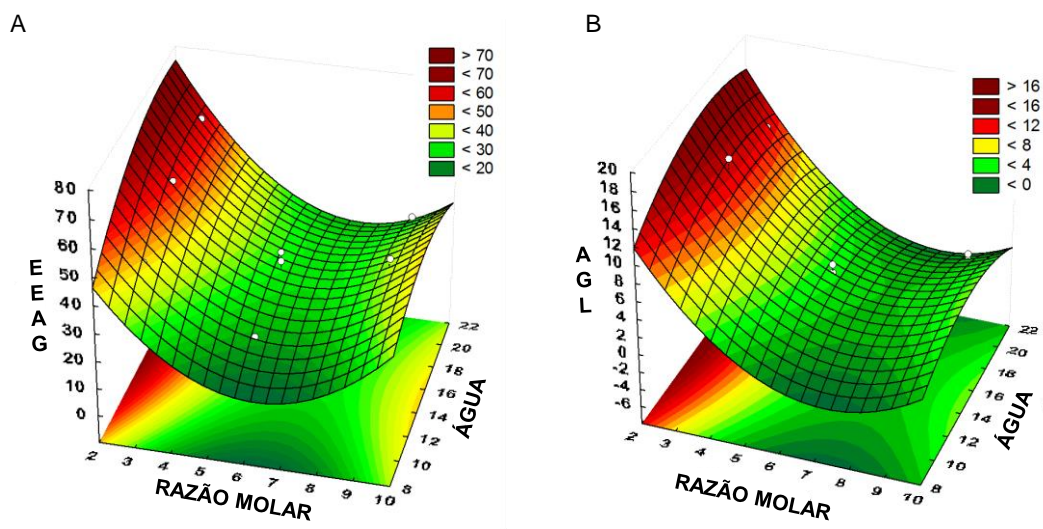


Figura 24. Superfície de resposta dos fatores razão molar etanol:óleo *versus* água (% m m⁻¹) para os resultados expressos como (A) teor de ésteres e (B) teor de ácidos graxos livres para o planejamento experimental da etanólise catalisada pela lipase livre em micro-ondas.

A validação dos modelos matemáticos propostos para prever variações nos teores de ésteres e de AGL do produto foi obtida pela realização de experimentos em duplicata na condição do planejamento experimental que favoreceu a maior conversão em ésteres. O valor predito pelo modelo para este ponto era de 59,6% de EEAG e o valor obtido experimentalmente foi de 64,05%. Já para o modelo do teor de AGL, o valor previsto era de 12,4% de AGL e no experimento foram obtidos $12,3 \pm 0,1\%$. Com isto, pode-se dizer que ambos os modelos gerados são válidos para descrever as tendências observadas no sistema.

Nas melhores condições deste planejamento (razão molar etanol:óleo de 3:1, 3% de enzima e 20,3% de água), um teor de 61,6% em ésteres foi alcançado sob irradiação de micro-ondas em apenas 1 h (Tabela 11, ensaio 3), enquanto que o teor obtido em aquecimento convencional foi de 21,4% (Tabela 11, ensaio 18) e, utilizando micro-ondas sem a adição de enzima, não houve praticamente nenhuma formação de ésteres etílicos (Tabela 11, ensaio 17). Estes resultados sugerem que o aumento na taxa de síntese de ésteres é consequência de um efeito positivo da associação entre a irradiação de micro-ondas e a catálise enzimática. Tal efeito já havia sido observado anteriormente por Yu *et al.* (2010), que atingiram rendimentos

de 94% em ésteres metílicos em reações catalisadas pela lipase Novozym 435 em 12 h de reação sob irradiação de micro-ondas, comparado ao alcance destes rendimentos apenas em 24 h sob aquecimento convencional.

Após validação dos planejamentos experimentais, a reação sob irradiação de micro-ondas que resultou no maior teor em ésteres foi monitorada de 5 min a 4 h (Figura 25). Tais resultados foram então comparados aos obtidos em reações realizadas sob as melhores condições encontradas do aquecimento convencional, no período de 15 min a 8 h (Figura 25).

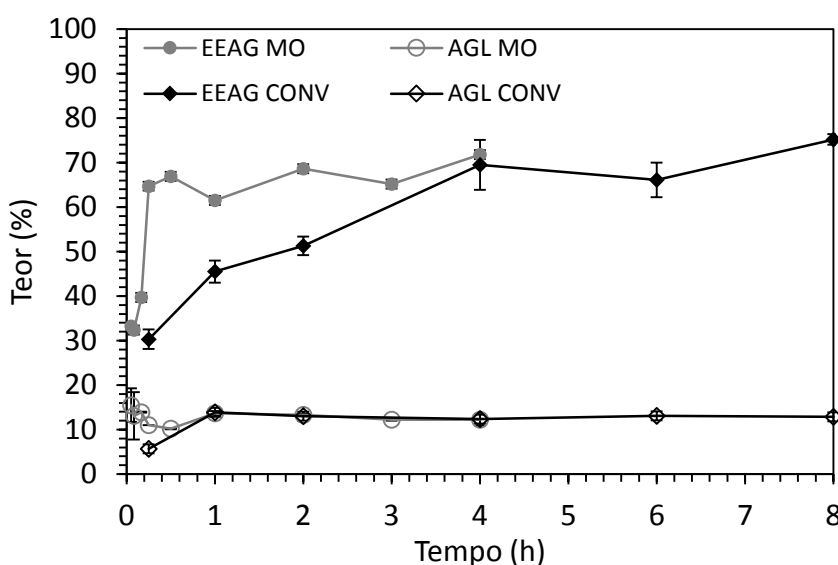


Figura 25. Acompanhamento das reações de etanólise catalisadas pela lipase livre sob aquecimento convencional e de micro-ondas, realizadas nas condições de melhor resposta para a produção de ésteres etílicos de ácidos graxos.

O teste de Tukey a um nível de confiança de 95% apontou que não existem diferenças significativas entre os teores de ésteres obtidos sob irradiação de micro-ondas entre 15 min até 4 h de reação. Isto sugere que as taxas reacionais após o período de 15 min são muito baixas, portanto, nestas condições, o aumento do tempo reacional não proporcionaria significativo incremento dos teores de EEAG. O teste de Tukey neste mesmo nível de confiança, realizado para os teores de AGL nestas condições, indicou que as médias dos teores obtidos em 15 e 30 min não diferem estatisticamente, porém, há diferença em 1 h, sendo que o teor aumenta aproximadamente 3 p.p., mantendo-se relativamente constante após este período. O mesmo teste, quando aplicado aos teores de EEAG obtidos sob aquecimento convencional, apontou que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos no período de 4 a 8 h. Os teores de AGL também não diferem estatisticamente após 1 h, como indicado para o aquecimento por micro-ondas. Assim, é possível inferir que o aquecimento por micro-

ondas tem a capacidade de alterar a cinética das reações, porém, após um curto período de tempo, estas entram em equilíbrio termodinâmico.

A irradiação de micro-ondas acelerou a cinética das reações e, sob sua ação, o equilíbrio da etanólise foi atingido 16 vezes mais rapidamente do que na sua ausência. Esta redução do tempo necessário para a obtenção de elevados teores em ésteres quando se utiliza o micro-ondas em relação ao aquecimento convencional já foi relatada por Queiroz *et al.* (2015), que estudaram a etanólise de óleo de soja na presença de *t*-butanol empregando a lipase Novozym 435. As condições de 10% de *t*-butanol e razão molar etanol:óleo de 3:1 a 60 °C e 50 W forneceram conversões em ésteres de até 100% em 3 h, enquanto que uma conversão de 57% foi obtida sob aquecimento convencional em condições similares. O fato de reduções maiores terem sido alcançadas neste trabalho, para cerca de 15 min de reação, pode estar relacionado ao emprego da CalB L, uma vez que o emprego da enzima livre diminui problemas de transferência de massa que acabam comprometendo o desempenho de enzimas imobilizadas (MACEIRAS *et al.*, 2011).

Outra abordagem para elevar a produção de ésteres foi a de estudar a reação em diferentes temperaturas, uma vez que, com o seu aumento, uma maior quantidade de energia é fornecida ao meio de reação, aumentando a frequência de colisões efetivas entre as moléculas dos reagentes. Ademais, é importante ressaltar que o aumento da temperatura de reação está associado a uma elevação proporcional no valor da potência irradiada. Então, as condições de reação que proporcionaram o maior teor em ésteres no planejamento experimental da Tabela 11 (ensaio 3) foram realizadas variando-se a temperatura para 50 °C e 70 °C, mantendo o tempo da reação de 15 min. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 13.

Na Tabela 13 observa-se que o aumento da temperatura não ocasionou alteração nos teores de ésteres alcançados. Isto pode estar relacionado ao fato de que a 40 °C as colisões entre as moléculas de reagentes e também seu acesso ao sítio catalítico já estão maximizados, assim, o fornecimento de uma maior quantidade de energia ao sistema não alterou a produção em ésteres, que manteve-se praticamente constante na faixa de temperaturas estudada. O teste de Tukey a um nível de confiança de 95% confirmou esta observação, indicando que não existem diferenças estatisticamente significativas entre os teores de ésteres obtidos. Por outro lado, os teores de AGL obtidos a 70 °C foram em média 6,6 p.p. inferiores aos obtidos a 40 °C e, segundo o teste de Tukey, este foi o único valor que apresentou diferenças significativas em relação aos demais. Apesar da diminuição do teor em ácidos graxos livres representar uma vantagem, a estabilidade da lipase livre é prejudicada em temperaturas acima de 60 °C

(NOVOZYMES, 2015). Portanto, os experimentos de reuso foram realizados na temperatura de 40 °C.

Tabela 13. Respostas expressas como teores de ésteres e de ácidos graxos livres obtidos para as reações de etanólise catalisadas pela lipase livre em diferentes temperaturas sob irradiação de micro-ondas.

Temperatura	Teor de EEAG	Teor de AGL
40 °C	64,7 ± 2,5	11, 0 ± 0,1
50 °C	60,9 ± 3,0	8,5 ± 2,4
70 °C	61,9 ± 2,4	4,4 ± 1,4

As tendências observadas para os planejamentos realizados com a enzima livre nos diferentes tipos de aquecimento apresentaram semelhanças. Por exemplo, ambos os planejamentos indicaram que razões molares elevadas são prejudiciais à produção de ésteres, uma vez que nos dois casos este pode causar a inativação da enzima. No entanto, os ensaios realizados no agitador orbital indicaram a melhor resposta em ésteres para uma reação realizada com menor quantidade de água (10,3%) e maior quantidade de enzima (7%), diferentemente do observado no reator de micro-ondas, em que o maior conteúdo de água (20,3%) e menor de enzima (3%) foi o que levou ao melhor resultado. Isto comprova que, sob irradiação de micro-ondas, é possível a obtenção de teores em ésteres significativos utilizando uma menor quantidade de catalisador. Osuna e Rivero (2012) afirmaram que a intensificação do processo de síntese de ésteres com o uso do aquecimento dielétrico pode reduzir a quantidade necessária de catalisador em até dez vezes. Nos dois sistemas de aquecimento estudados, também foi constatada a influência expressiva da razão molar sobre o decréscimo da acidez final do produto, sugerindo que esta variável ainda precisa ser mais bem avaliada. Além disso, o uso de micro-ondas também aumentou o teor de AGL final para até 14,7%. Portanto, o aquecimento dielétrico intensificou ambas as reações catalisadas pela CalB L.

As diferenças observadas para os experimentos realizados sob distintas formas de aquecimento apontam que o uso de micro-ondas é mais efetivo, uma vez que permite o aquecimento volumétrico da amostra. Além disto, o etanol maximiza as interações com a energia de micro-ondas, causando um aumento da velocidade de reação (NOGUEIRA *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2010; OSUNA e RIVERO, 2012).

5.8. Reuso da lipase livre na síntese de ésteres etílicos sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas

O reuso de lipases livres já foi relatado por alguns autores (REN *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2013b; PEDERSEN *et al.*, 2014), que demonstraram a eficiência da reutilização da fase aquosa formada ao término das reações. Assim, primeiramente foi realizada uma reação nas melhores condições descritas nos itens 5.5 e 5.7, sob aquecimento convencional e dielétrico, respectivamente. Na Tabela 14 encontram-se os resultados expressos em teores de EEAG e de AGL para o primeiro reuso da fase aquosa nos diferentes tipos de aquecimento. Com base nos teores de ésteres obtidos para o primeiro reuso, observa-se que é realmente possível empregar a fase aquosa para a catálise de uma nova reação sem perda total da atividade catalítica da lipase contida neste meio, tanto no caso do aquecimento convencional quanto no aquecimento por micro-ondas. O primeiro ciclo de reuso sob aquecimento convencional exibiu um teor de ésteres que representou 85,5% do obtido na reação com a enzima fresca, enquanto que o primeiro ciclo de reuso sob micro-ondas apresentou um valor de 80,7% para este mesmo parâmetro. Quanto ao teor de AGL obtido do reuso realizado sob aquecimento convencional, nota-se que este foi reduzido em 4,1 p.p. em comparação ao obtido no primeiro ciclo de uso da enzima, fato relacionado ao efeito do glicerol que impede que o excesso de água alcance o sítio ativo da enzima, reduzindo assim a ocorrência de reações de hidrólise (TAMAYO *et al.*, 2012). Já o teor de AGL para o reuso sob micro-ondas não apresentou diferença significativa em relação à primeira reação, isto porque o conteúdo de água era superior (20,3%) ao empregado no aquecimento convencional (10,3%); portanto, neste caso, as reações de hidrólise ainda foram favorecidas.

A manutenção da atividade enzimática após um ciclo de reação parece estar associada à presença do glicerol, que tem a função de preservar a estrutura e evitar a desnaturação das proteínas (TAMAYO *et al.*, 2012). Portanto, os resultados aqui relatados sugerem que é possível reutilizar a CalB livre, porém, para a obtenção de maiores teores em EEAG a cada ciclo de reuso, esta etapa do trabalho ainda necessita ser otimizada, visto que alguns autores já realizaram o reuso de lipases livres por diversos ciclos de reação sem perdas significativas dos conteúdos em ésteres. Por exemplo, Ren *et al.* (2011) realizaram a etanolise do óleo de soja catalisada pela lipase livre NS81006 (*A. niger*) em um sistema bifásico (água/óleo) e alcançaram teores de 90% em ésteres com um conteúdo de água de 20% e razão molar etanol:óleo de 5,5:1 a 45 °C e 1200 rpm, sendo que a adição do etanol foi realizada em etapas.

Estes autores demonstraram que, com o uso repetido e direto da fase aquosa obtida após cada etapa de reação, o rendimento em ésteres manteve-se constante em 90% após cinco ciclos.

Tabela 14. Respostas expressas como teores de ésteres e de ácidos graxos livres para as reações de reuso da lipase livre sob aquecimento convencional e irradiação de micro-ondas.

Tipo de aquecimento	1° Uso^a	1° Reuso^b
<i>Teor de EEAG</i>		
Convencional ^c	85,3 ± 3,1	72,9 ^e
Micro-ondas ^d	64,7 ± 2,5	52,2 ^e
<i>Teor de AGL</i>		
Convencional ^c	6,5 ± 0,6	2,4 ± 0,1 ^f
Micro-ondas ^d	11,0 ± 0,1	9,8 ± 0,1 ^f

^aReações realizadas nas condições que forneceram os maiores teores em ésteres, empregando a lipase fresca como catalisador; ^bReações realizadas nas condições que forneceram os maiores teores em ésteres, empregando a lipase contida na fase aquosa como catalisador; ^cReações realizadas em agitador orbital (150 rpm, 40 °C); ^dReações realizadas em reator de micro-ondas (40 °C); ^eTeores de EEAG do produto final, corrigido pela determinação do teor de EEAG remanescente na fase aquosa; ^fTeores de AGL do produto final, corrigido pela determinação do teor de AGL remanescente na fase aquosa.

A diminuição do teor em ésteres produzido pode estar relacionada à concentração dos componentes que permaneceram nas fases orgânica e aquosa após a etapa de separação das fases, previamente à sua reutilização. Ademais, a composição de ambas as fases foi analisada para a adequação das condições reacionais e ajuste do resultado final obtido após o ciclo de reuso. A Tabela 15 mostra a composição das fases aquosas e orgânicas derivadas de reações realizadas com a enzima fresca nos diferentes tipos de aquecimento.

Conforme a Tabela 15, apenas um pequeno percentual de ésteres e de ácidos graxos livres permaneceu presente nas fases aquosas obtidas das reações em aquecimento convencional e em micro-ondas e estes valores foram considerados para o cálculo dos teores finais de EEAG e de AGL apresentados na Tabela 14. Além disso, o conteúdo de etanol presente nas fases orgânicas foi inferior ao encontrado nas fases aquosas; portanto, devido a sua alta polaridade, a maior parte do etanol remanescente da reação deslocou-se para a fase aquosa. Como o objetivo dos experimentos de reuso da lipase era de realizar a reação nas mesmas condições em que a fase aquosa foi obtida, o conteúdo em etanol ainda presente na fase aquosa foi considerado para ajustar a razão molar etanol:óleo desejada. Para isto, o teor de etanol em ambas as fases obtidas ao final de cada ciclo de reação foi analisado e o valor encontrado na fase aquosa foi considerado no ajuste da razão molar etanol:óleo.

Tabela 15. Composição das fases orgânicas e aquosas obtidas após reação nas melhores condições sob aquecimento convencional e sob irradiação de micro-ondas.

	Glicerol^a	Etanol^b	EEAG^c	AGL^d
<i>Convencional</i>				
Fase Aquosa	5,21 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,03
Fase Orgânica	2,53 ± 1,0	0,1 ± 0,1	85,3 ± 3,1	6,5 ± 0,6
<i>Micro-ondas</i>				
Fase Aquosa	3,44 ± 0,4	1,8 ± 0,3	3,4 ± 1,1	0,1
Fase Orgânica	1,51 ± 0,9	0,2 ± 0,1	64,7 ± 2,5	11,0 ± 0,1

^aQuantidade de glicerol em g encontrado no volume total da amostra; ^bQuantidade de etanol em g encontrado no volume total da amostra; ^cTeor de ésteres etílicos de ácidos graxos totais (EEAG) em porcentagem (m m⁻¹); ^dTeor de ácidos graxos livres (AGL), expresso como percentual em ácido oleico (m m⁻¹).

A Tabela 15 apresenta também os conteúdos de glicerol nas fases orgânica e aquosa e é possível notar que o glicerol se concentra nas fases aquosas obtidas sob os diferentes modos de aquecimento. No entanto, 32,7% do conteúdo total de glicerol foi encontrado na fase orgânica obtida sob aquecimento convencional e 30,5% na fase orgânica do aquecimento dielétrico. Ren *et al.* (2012), afirmaram que a lipase permanece na fase aquosa do sistema devido a sua interação preferencial com o glicerol nela concentrado. Porém, neste estudo, um conteúdo considerável de glicerol ainda estava presente na fase orgânica do sistema. Assim, é provável que o motivo da diminuição da produção de ésteres tenha sido a perda de parte das enzimas que permaneceram com o glicerol na fase orgânica.

Estes resultados indicam a necessidade de aprimorar a etapa de reciclagem da enzima, com a finalidade de evitar perdas de catalisador e proporcionar elevados teores em ésteres nos ciclos de reuso da lipase, tornando o processo mais vantajoso. Além disso, ainda é necessário avaliar o impacto da formação de glicerol a cada ciclo de reuso, uma vez que o seu acúmulo reduziria a capacidade do reator para a etapa subsequente de reuso, reduzindo a eficiência volumétrica do processo e também alterando as condições de reação a cada novo ciclo (PEDERSEN *et al.*, 2014).

6. CONCLUSÃO

As lipases comerciais de *C. antarctica* B, livres e imobilizadas, apresentam comportamentos diferentes em meios reacionais empregados para a síntese de ésteres. Isto foi previamente sugerido por suas atividades distintas, tanto em reações de hidrólise, que são realizadas a uma velocidade significativamente maior pela enzima livre, quanto em reações de síntese de ésteres em meio aquorrestrito, em que a lipase imobilizada apresentou maior atividade.

Os ensaios realizados de maneira independente indicaram que a lipase livre apresenta maior atividade na presença de até 10,3% de água adicionada ao meio e com baixas concentrações de etanol. Além disso, a presença de 10% de hexano como solvente foi prejudicial para a obtenção de ésteres. O planejamento multivariado sob aquecimento convencional confirmou que altas concentrações de etanol são prejudiciais a produção de ésteres, porém, são imprescindíveis para diminuir a formação de ácidos graxos livres. Ademais, a melhor resposta em teor de ésteres foi obtida com 7% de CalB L, 10,3% de água e razão molar etanol:óleo de 3:1. Tal valor foi de 73,8%, porém, na presença de 12,8% de AGL. Assim, a razão molar etanol:óleo e o teor de água foram reavaliados para 4:1 e 5,3% respectivamente e, nestas condições, foi possível alcançar um teor em ésteres de 85,3% e reduzir o teor de ácidos graxos livres para 5,3%.

O estudo dos fatores que influenciam a síntese de ésteres catalisada pela lipase imobilizada, através de um planejamento multivariado, indicou que os fatores que tiveram maior influência neste processo foram: a porcentagem de água, que teve influência negativa, e a quantidade de enzima, que influenciou positivamente nesta resposta. Além disso, a interação entre o teor de água e a razão molar também teve influência positiva. O ponto de maior teor em ésteres do planejamento foi obtido com a maior concentração de catalisador (7% de enzima), razão molar etanol:óleo de 6:1 e 0,3% de água, que proporcionou um teor de 53,7% em ésteres etílicos, com a vantagem de não aumentar o teor de AGL do produto. Isto demonstra o diferente comportamento da lipase imobilizada em relação à livre quanto ao conteúdo de água e etanol.

Já nas reações conduzidas em micro-ondas, o teste com Novozym 435 indicou que esta fonte de aquecimento não é adequada para o seu uso, pois causa a desestruturação do seu suporte de imobilização. Já os resultados obtidos para a etanólise catalisada pela enzima livre assistida por micro-ondas apontaram a eficiência da irradiação na intensificação da reação. O maior teor de ésteres (61,6%) foi obtido na presença de razão molar etanol:óleo de 3:1, 3% de enzima (m m^{-1}) e porcentagem de água de 20,3% (m m^{-1}). Este resultado, comparado ao encontrado sob

aquecimento convencional nas mesmas condições (21,4% em EEAG), demonstra a viabilidade do uso da irradiação de micro-ondas para promover a produção de ésteres etílicos catalisada pela CalB L. Além disso, o monitoramento desta reação sob irradiação de micro-ondas demonstrou que o mesmo teor em ésteres pode ser obtido em apenas 15 min com a vantagem do produto apresentar um teor de AGL em torno de 3 p.p. menor do que o obtido em 1 h. Por outro lado, o aumento da temperatura desta reação para 50 °C e 70 °C não resultou em diferença em relação aos teores de ésteres obtidos sob a temperatura de 40 °C.

A maior parte da lipase livre utilizada sob aquecimento tanto convencional quanto dielétrico foi recuperada na fração aquosa formada após o término da reação e esta manteve atividade catalítica. Este resultado indicou que a CalB livre pode ser reaproveitada para a síntese de ésteres etílicos em sistema livre de solventes, independentemente da estratégia utilizada para o aquecimento do meio de reação.

7. REFERÊNCIAS

- ABBASZAADEH, A.; GHOBADIAN, B.; OMIDKHAH, M. R.; NAJAFI, G. Current biodiesel production technologies: A comparative review. **Energy Conversion and Management**, v. 63, p. 138-148, 2012.
- ADACHI, D.; KODA, R.; HAMA, S.; YAMADA, R.; NAKASHIMA, K.; OGINO, C.; KONDO, A. An integrative process model of enzymatic biodiesel production through ethanol fermentation of brown rice followed by lipase-catalyzed ethanolysis in a water-containing system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 2, p. 118-122, 2013.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; DE CASTRO, A. M.; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315-321, 2014.
- AL-ZUHAIR, S.; LING, F. W.; JUN, L. S. Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 951-960, 2007.
- ALNOCH, R. C. **Imobilização e caracterização de uma nova lipase obtida por prospecção metagenômica**. 113 f. (Mestrado - Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2013.
- ANP. **AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS**. Disponível em: <www.anp.gov.br/>. Acesso em: 10/06/2015.
- ANP. **Boletim mensal do biodiesel - mês de abril**. Disponível em: <http://anp.gov.br/>. Acesso em: 20/05/2015.
- ANTCZAK, M. S.; KUBIAK, A.; ANTCZAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185-1194, 2009.
- ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482 de 23 de setembro de 1999**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a2190900474588939242d63fbc4c6735/RDC_482_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 23/05/2015.
- AOCS. **Official Methods and Recommended Practices, Ca 5a-40**. 1989.
- AOCS. **Official Methods and Recommended Practices, Cd 3-25**. 1990.
- ARANSIOLA, E. F.; OJUMU, T. V.; OYEKOLA, O. O.; MADZIMBAMUTO, T. F.; IKHU-OMOREGBE, D. I. O. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 276-297, 2014.
- ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; ABDUL AZIZ, A. R.; SULAIMAN, N. M. N. The effects of catalysts in biodiesel production: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 14-26, 2013.

AUED-PIMENTEL, S.; KUMAGAI, E. E.; KUS, M. M. M.; CARUSO, M. S. F.; TAVARES, M.; ZENEBON, O. Ácidos graxos trans em óleos vegetais refinados poli-insaturados comercializados no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 646-651, 2009.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9-14, 2010.

BARNARD, T. M.; LEADBEATER, N. E.; BOUCHER, M. B.; STENCEL, L. M.; WILHITE, B. A. Continuous-Flow Preparation of Biodiesel Using Microwave Heating. **Energy & Fuels**, v. 21, p. 1777-1781, 2007.

BASHA, S. A.; GOPAL, K. R.; JEBARAJ, S. A review on biodiesel production, combustion, emissions and performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6–7, p. 1628-1634, 2009.

BERRIOS, M.; SKELTON, R. L. Comparison of purification methods for biodiesel. **Chemical Engineering Journal**, v. 144, n. 3, p. 459-465, 2008.

BOEY, P.-L.; GANESAN, S.; MANIAM, G. P.; KHAIRUDDEAN, M.; LIM, S.-L. A new catalyst system in transesterification of palm olein: Tolerance of water and free fatty acids. **Energy Conversion and Management**, v. 56, n. 0, p. 46-52, 2012.

BORGES, M. E.; DÍAZ, L. Recent developments on heterogeneous catalysts for biodiesel production by oil esterification and transesterification reactions: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2839-2849, 2012.

BORNSCHEUER, U. T.; BESSLER, C.; SRINIVAS, R.; HARI KRISHNA, S. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. **Trends in Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 433-437, 2002.

BRIGGS, J.; FINCH, P.; MATULEWICZ, M. C.; WEIGEL, H. Complexes of copper (II), calcium, and other metal ions with carbohydrates: Thin-layer ligand-exchange chromatography and determination of relative stabilities of complexes. **Carbohydrate Research**, v. 97, n. 2, p. 181-188, 1981.

CABRERA, Z.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1–4, p. 171-176, 2009.

CEN. European Committee for Standardization. **EN 14103, Fat and oil derivatives. Fatty acid methyl esters (FAME). Determination of ester and linolenic acid methyl ester contents**. 2011.

CHAMOULEAU, F.; COULON, D.; GIRARDIN, M.; GHOUL, M. Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4–6, p. 949-954, 2001.

CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A.; LIMKATANYU, S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 261-269, 2008.

CHEN, B.; HU, J.; MILLER, E. M.; XIE, W.; CAI, M.; GROSS, R. A. *Candida antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro- and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 463-471, 2008.

CHEN, K.-S.; LIN, Y.-C.; HSU, K.-H.; WANG, H.-K. Improving biodiesel yields from waste cooking oil by using sodium methoxide and a microwave heating system. **Energy**, v. 38, n. 1, p. 151-156, 2012.

CHEN, Y.; XIAO, B.; CHANG, J.; FU, Y.; LV, P.; WANG, X. Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 3, p. 668-673, 2009.

CHESTERFIELD, D. M.; ROGERS, P. L.; AL-ZAINI, E. O.; ADESINA, A. A. Production of biodiesel via ethanolysis of waste cooking oil using immobilised lipase. **Chemical Engineering Journal**, v. 207-208, p. 701-710, 2012.

CHRISTOPHER, L. P.; HEMANATHAN, K.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

CORDEIRO, C. S.; SILVA, F. R.; WYPYCH, F.; RAMOS, L. P. Catalisadores heterogêneos para a produção de monoésteres graxos (biodiesel). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 477-487, 2011.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, W. C. e.; GRABAUSKAS, D.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 313-320, 2014.

DA RÓS, P. M.; DE CASTRO, H.; CARVALHO, A. F.; SOARES, C. F.; DE MORAES, F.; ZANIN, G. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 529-536, 2012.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776-792, 2009.

DEMIRBAS, A. Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 31, n. 5-6, p. 466-487, 2005.

DENG, L.; XU, X.; HARALDSSON, G.; TAN, T.; WANG, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, p. 341-347, 2005.

DI SERIO, M.; TESSER, R.; PENGMEI, L.; SANTACESARIA, E. Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production. **Energy & Fuels**, v. 22, p. 207-217, 2008.

DOMINGOS, A. K.; SAAD, E. B.; WILHELM, H. M.; RAMOS, L. P. Optimization of the ethanolysis of *Raphanus sativus* (L. Var.) crude oil applying the response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1837-1845, 2008.

DOSSAT, V.; COMBES, D.; MARTY, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 1, p. 90-94, 2002.

ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ, J. F.; RODRÍGUEZ-REINARES, A. Ethanolysis of used frying oil. Biodiesel preparation and characterization. **Fuel Processing Technology**, v. 88, n. 5, p. 513-522, 2007.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry**. New York: Springer, 2004.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; CABRERA, Z.; GODOY, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PALOMO, J. M.; GUISAN, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061-1067, 2008.

FORESTI, M. L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M. L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 69-77, 2005.

FORTUNY, M.; RAMOS, A. L. D.; DARIVA, C.; EGUES, S. M. S.; SANTOS, A. F.; NELE, M.; COUTINHO, R. C. C. Principais aplicações das micro-ondas na produção e refino de petróleo. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1553-1561, 2008.

GARCIA, C. M. **Transesterificação de óleos vegetais**. 165 f. (Mestrado - Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2006.

GERPEN, J. V. Biodiesel processing and production. **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1097-1107, 2005.

GHESTI, G. F.; MACEDO, J. L.; DIAS, J. A.; DIAS, S. C. L. Produção de biodiesel via transesterificação etílica com zeólitas básicas. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 119-123, 2012.

GOG, A.; ROMAN, M.; TOŞA, M.; PAIZS, C.; IRIMIE, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 10-16, 2012.

GOMES, J. C.; SOARES, L. F.; PEREIRA, C. A. d. S.; JHAM, G. N. Efeito do dessecante paraquat na qualidade da fração lipídica da soja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 178-184, 2003.

GRABOSKI, M. S.; MCCORMICK, R. L. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 24, n. 2, p. 125-164, 1998.

GUDE, V. G.; PATIL, P.; MARTINEZ-GUERRA, E.; DENG, S.; NIRMALAKHANDAN, N. Microwave energy potential for biodiesel production **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 5, p. 1-31, 2013.

GULDHE, A.; SINGH, B.; MUTANDA, T.; PERMAUL, K.; BUX, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, p. 1447-1464, 2015.

GUO, M.; SONG, W.; BUHAIN, J. Bioenergy and biofuels: History, status, and perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 712-725, 2015.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386-395, 2013.

HAMA, S.; TAMALAMPUDI, S.; YOSHIDA, A.; TAMADANI, N.; KURATANI, N.; NODA, H.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Process engineering and optimization of glycerol separation in a packed-bed reactor for enzymatic biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10419-10424, 2011.

HÄMÄLÄINEN, M. M.; LÖNNBERG, H. Complexing of sugars and sugar alcohols with metal ions: a comparative study by ion-exchange chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 215, n. 2, p. 357-360, 1991.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipzyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277-286, 2008.

ISLAM, A.; TAUFIQ-YAP, Y. H.; CHU, C.-M.; CHAN, E.-S.; RAVINDRA, P. Studies on design of heterogeneous catalysts for biodiesel production. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 91, n. 1-2, p. 131-144, 2013.

ISSARIYAKUL, T.; KULKARNI, M. G.; DALAI, A. K.; BAKHSHI, N. N. Production of biodiesel from waste fryer grease using mixed methanol/ethanol system. **Fuel Processing Technology**, v. 88, n. 5, p. 429-436, 2007.

IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology. Disponível em: <<http://www.iubmb.org/>>. Acesso em: 15/05/2015.

IZQUIERDO, D. F.; BARBOSA, O.; BURGUETE, M. I.; LOZANO, P.; LUIS, S. V.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GARCIA-VERDUGO, E. Tuning lipase B from *Candida antarctica* C-C bond promiscuous activity by immobilization on poly-styrene-divinylbenzene beads. **RSC Advances**, v. 4, n. 12, p. 6219-6225, 2014.

JAEGER, K.-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipase. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315-351, 1999.

JOSÉ, C.; BONETTO, R. D.; GAMBARO, L. A.; TORRES, M. d. P. G.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L.; BRIAND, L. E. Investigation of the causes of deactivation-degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol-aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3-4, p. 95-107, 2011.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual do Biodiesel**. São Paulo: Edgard Blücher, 2006.

KOCHEPKA, D. M. **Produção de ésteres etílicos a partir de óleos e gorduras residuais emrpegando a lipase Novozym 435**. 101 f. (Mestrado - Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2015.

KOTRBA, R. **Blue Sun launches commercial-scale enzymatic biodiesel process**. Disponível em: <<http://www.biodieselmagazine.com/>>. Acesso em: 15/05/2015.

KOTRBA, R. **Piedmont proves out liquid enzyme catalysis**. Disponível em: <<http://www.biodieselmagazine.com/>>. Acesso em: 15/05/2015.

KUCEK, K.; CÉSAR-OLIVEIRA, M.; WILHELM, H.; RAMOS, L. Ethanolysis of Refined Soybean Oil Assisted by Sodium and Potassium Hydroxides. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, n. 4, p. 385-392, 2007.

KUCEK, K. T. **Otimização da transesterificação etílica do óleo de soja em meio alcalino**. 123 f. (Mestrado - Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

KUSDIANA, D.; SAKA, S. Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment. **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 289-295, 2004.

LEE, A. F.; BENNETT, J. A.; MANAYIL, J. C.; WILSON, K. Heterogeneous catalysis for sustainable biodiesel production via esterification and transesterification. **Royal Society of Chemistry**, v., p. 2014.

LI, Q.; XU, J.; DU, W.; LI, Y.; LIU, D. Ethanol as the acyl acceptor for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 25, p. 742-748, 2013a.

LI, Y.; DU, W.; LIU, D. Effect of phospholipids on free lipase-mediated methanolysis for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 91, p. 67-71, 2013b.

LIDSTRÖM, P.; TIERNEY, J.; WATHEY, B.; WESTMAN, J. Microwave assisted organic synthesis — a review. **Tetrahedron**, v. 57, n. 45, p. 9225-9283, 2001.

LOURINHO, G.; BRITO, P. Advanced biodiesel production technologies: novel developments. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, p. 287–316, 2015.

LOWRY, R. R. e TINSLEY, I. J. Rapid Colorimetric Determination of Free Fatty Acids. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 53, n. 7, p. 470-472, 1976.

LU, J.; CHEN, Y.; WANG, F.; TAN, T. Effect of water on methanolysis of glycerol trioleate catalyzed by immobilized lipase *Candida sp.* 99–125 in organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 2–3, p. 122-125, 2009.

MA, F.; HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

MACEIRAS, R.; VEGA, M.; COSTA, C.; RAMOS, P.; MÁRQUEZ, M. C. Enzyme deactivation during biodiesel production. **Chemical Engineering Journal**, v. 166, n. 1, p. 358-361, 2011.

MANJÓN, A.; IBORRA, J. L.; AROCAS, A. Short-chain flavour ester synthesis by immobilized lipase in organic media. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 5, p. 339-344, 1991.

MARTINI, V. P. **Caracterização Molecular e Bioquímica de Novas Lipases obtidas por Prospecção Metagenômica com Aplicação em Biocatálise**. 128 f. (Doutorado - Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.

MARTY, A.; DOSSAT, V.; CONDORET, J. S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. **Biotechnology Bioenergy**, v. 56, n. 2, p. 232-237, 1997.

MEI, Y.; MILLER, L.; GAO, W.; GROSS, R. A. Imaging the Distribution and Secondary Structure of Immobilized Enzymes Using Infrared Microspectroscopy. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 70-74, 2003.

MENDOW, G.; VEIZAGA, N. S.; QUERINI, C. A. Ethyl ester production by homogeneous alkaline transesterification: Influence of the catalyst. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 11, p. 6385-6391, 2011.

MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; BRANDÃO E MELO FRANCO, P. I.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 10-15, 2013.

MOTASEMI, F.; ANI, F. N. A review on microwave-assisted production of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 4719-4733, 2012.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal Lipid Science Technology**, v. 110, p. 692-700, 2008.

NOGUEIRA, B. M.; CARRETONI, C.; CRUZ, R.; FREITAS, S.; MELO JR, P. A.; COSTA-FÉLIX, R.; PINTO, J. C.; NELE, M. Microwave activation of enzymatic catalysts for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1-2, p. 117-121, 2010.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769-777, 2005.

NOYES, A.; GODAVARTI, R.; TITCHENER-HOOKER, N.; COFFMAN, J.; MUKHOPADHYAY, T. Quantitative high throughput analytics to support polysaccharide production process development. **Vaccine**, v. 32, n. 24, p. 2819-2828, 2014.

OSUNA, V.; RIVERO, I. A. Study of the Influence of Microwave and Conventional Heating on the Lipase-Catalyzed Esterification of Lauric Acid with Different Alcohols. **Journal of the Mexican Chemical Society**, v. 56, p. 176-182, 2012.

PÁEZ, B. C.; MEDINA, A. R.; RUBIO, F. C.; MORENO, P. G.; GRIMA, E. M. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 845-853, 2003.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 3-5, p. 187-204, 2000.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PEDERSEN, A. T.; NORDBLAD, M.; NIELSEN, P. M.; WOODLEY, J. M. Batch production of FAEE-biodiesel using a liquid lipase formulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 89-94, 2014.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015a.

POPPE, J. K.; MATTE, C. R.; PERALBA, M. d. C. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Optimization of ethyl ester production from olive and palm oils using mixtures of immobilized lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 490, p. 50-56, 2015b.

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v. 35, n. 11, p. 5393-5398, 2007.

QIN, H.; YAN, X.; YUN, T.; DONG, W. Biodiesel Production Catalyzed by Whole-Cell Lipase from *Rhizopus chinensis*. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 29, n. 1, p. 41-46, 2008.

QUEIROZ, M. L. B.; BOAVENTURA, R. F.; MELO, M. N.; ALVAREZ, H. M.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á. S.; HEREDIA, M. F.; DARIVA, C.; FRICKS, A. T. Microwave activation of immobilized lipase for transesterification of vegetable oils. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 303-308, 2015.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, n. 2, p. 145-150, 2002.

REJASSE, B.; BESSONEN, T.; LEGOY, M.-D.; LAMARE, S. Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. **Organic biomolecules & Chemistry**, v. 4, p. 3703-3707, 2006.

REJASSE, B.; LAMARE, S.; LEGOY, M.-D.; BESSON, T. Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 518-526, 2007.

REJASSE, B.; LAMARE, S.; LEGOY, M.; BESSON, T. Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. **Organic biomolecules & Chemistry**, v. 22, n. 5, p. 518-526, 2004.

REN, H.; DU, W.; LV, L.; LIU, D. Study on Free Lipase-Catalyzed Ethanolysis for Biodiesel Preparation in an Oil/Water Biphasic System. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 10, p. 1551-1555, 2011.

RIBEIRO, L. M. O.; SANTOS, B. C. d. S.; ALMEIDA, R. M. R. G. Studies on reaction parameters influence on ethanolic production of coconut oil biodiesel using immobilized lipase as a catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 47, p. 498-503, 2012.

RICO, J. A. P.; SAUER, I. L. A review of Brazilian biodiesel experiences. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 45, p. 513-529, 2015.

SANSEVERINO, A. M. Micro-ondas em síntese orgânica. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 660-667, 2002.

SANTORI, G.; DI NICOLA, G.; MOGLIE, M.; POLONARA, F. A review analyzing the industrial biodiesel production practice starting from vegetable oil refining. **Applied Energy**, v. 92, p. 109-132, 2012.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998.

SECUNDO, F.; CARREA, G.; SOREGAROLI, C.; VARINELLI, D.; MORRONE, R. Activity of different *Candida antarctica* lipase B formulations in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, n. 2, p. 157-163, 2001.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 409-414, 2007.

SHIMADA, Y.; WATANABE, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 17, n. 3-5, p. 133-142, 2002.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

TALUKDER, M. M. R.; WU, J. C.; VAN NGUYEN, T. B.; FEN, N. M.; MELISSA, Y. L. S. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 3-4, p. 106-112, 2009.

TAMAYO, J. J.; LADERO, M.; SANTOS, V. E.; GARCÍA-OCHOA, F. Esterification of benzoic acid and glycerol to α -monobenzoate glycerol in solventless media using an industrial free *Candida antarctica* lipase B. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 243-250, 2012.

TEIXEIRA, C. B.; MADEIRA JUNIOR, J. V.; MACEDO, G. A. Biocatalysis combined with physical technologies for development of a green biodiesel process. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 333-343, 2014.

THOMAS, A.; ALLOUCHE, M.; BASYN, F.; BRASSEUR, R.; KERFELEC, B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 40074-40083, 2005.

TISS, A., CARRIERE, F. e VERGER, R. Effects of gum arabic on lipase interfacial binding and activity. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 36-43, 2001.

ULLAH, F.; DONG, L.; BANO, A.; PENG, Q.; HUANG, J. Current advances in catalysis toward sustainable biodiesel production. **Journal of the Energy Institute**, v., p. IN PRESS, 2015.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, 1994.

VÉRAS, I. C.; SILVA, F. A. L.; FERRÃO-GONZALES, A. D.; MOREAU, V. H. One-step enzymatic production of fatty acid ethyl ester from high-acidity waste feedstocks in solvent-free media. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 20, p. 9653-9658, 2011.

VERMA, M. L.; AZMI, W.; KANWAR, S. S. Microbial lipases: at the interface of aqueous and non-aqueous media: A review. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 55, n. 3, p. 265-293, 2008.

VIDRIH, R.; VIDA KOVIČ, S.; ABRAMOVIČ, H. Biochemical Parameters and Oxidative Resistance to Thermal Treatment of Refined and Unrefined Vegetable Edible Oils. **Czech Journal of Food Sciences** v. 28, n. 5, p. 376-384, 2010.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** v. 9, p. 113-148, 2000.

VYAS, A. P.; VERMA, J. L.; SUBRAHMANYAM, N. A review on FAME production processes. **Fuel**, v. 89, n. 1, p. 1-9, 2010.

WATANABE, Y.; SHIMADA, Y.; SUGIHARA, A.; NODA, H.; FUKUDA, H.; TOMINAGA, Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 4, p. 355-360, 2000.

YADAV, G. D.; DEVI, K. M. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl

butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, v. 59, n. 2, p. 373-383, 2004.

YADAV, G. D.; THORAT, P. A. Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 16-22, 2012.

YAN, Y.; LI, X.; WANG, G.; GUI, X.; LI, G.; SU, F.; WANG, X.; LIU, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. **Applied Energy**, v. 113, p. 1614-1631, 2014.

YANG, B.; WANG, Y.-H.; YANG, J.-G. Optimization of enzymatic degumming process for rapeseed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 7, p. 653-658, 2006.

YOUNG, D. D.; NICHOLS, J.; KELLY, R. M.; DEITERS, A. Microwave Activation of Enzymatic Catalysis. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 130, n. 31, p. 10048-10049, 2008.

YU, D.; TIAN, L.; MA, D.; WU, H.; WANG, Z.; WANG, L.; FANG, X. Microwave-assisted fatty acid methyl ester production from soybean oil by Novozym 435. **Green Chemistry**, v. 12, p. 844-850, 2010.

YU, D.; WANG, C.; YIN, Y.; ZHANG, A.; GAO, G.; FANG, X. A synergistic effect of microwave irradiation and ionic liquids on enzyme-catalyzed biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 13, n. 7, p. 1869-1875, 2011.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 82, p. 3192-3196, 1985.

ZHOU, W.; BOOCOCK, D. G. B. Phase behavior of the base-catalyzed transesterification of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 12, p. 1041-1045, 2006.